



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Evaluación de un medio óptimo para el crecimiento *in vitro* y *ex vitro* de orquídeas del género *Epidendrum* micorrizadas”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica.

Autoras:

Ana Daniela Niveló Vásquez

C.I.: 0104750302

Carla Roberta Rojas Pallashco

C.I.: 0106056393

Directora:

Ph.D Raffaella Ansaloni

C.I: 0103969432

Cuenca - Ecuador

2019

RESUMEN

La simbiosis hongo-orquídea (micorriza) es la interacción entre las hifas de una especie de hongos y las raíces de una planta, conformando una estructura a través de la cual se realiza intercambio de agua, nutrimentos y reguladores del crecimiento. Esta simbiosis ha permitido que las orquídeas crezcan y se adapten a diferentes tipos de hábitats.

En el presente estudio se utilizaron plántulas de *Epidendrum sp.* micorrizadas con dos hongos, *Sebacina vermífera* y *Ceratobasidium sp.*, para estudiar el crecimiento *in vitro* y *ex vitro* de las orquídeas, empleando tres diferentes medios de cultivo. El estudio se realizó en el Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca y se emplearon plántulas provenientes del proyecto “Estudio de la relación simbiótica orquídea- micorriza en la Provincia del Azuay, Ecuador” (DIUC XIV-16)”. Se prepararon los medios Murashige & Skoog modificado de banano (MS Modificado) y Agar avena (OMA) para el cultivo *in vitro*; y sustrato (corteza fina de pino, musgo tipo *Sphagnum* y piedra caliza) para el cultivo *ex vitro*. Se evaluó la viabilidad y el crecimiento de la orquídea en los tres medios de cultivo, con los dos tipos de hongos micorrízicos.

Los resultados mostraron que el medio que permitió una óptima viabilidad es Agar avena (OMA) para las plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera* (86%) y con *Ceratobasidium sp.* (73%). Al contrario, los medios que presentan menor porcentaje de viabilidad para *Sebacina vermífera* fue sustrato con el 59% y para *Ceratobasidium sp.* fue el medio MS Modificado de banano con el 22%.

El crecimiento *in vitro* fue más alto que el crecimiento *ex vitro*, siendo el medio Murashige & Skoog Modificado de banano el que presentó menor crecimiento, pero mayor homogeneidad de las plántulas. El medio Agar avena (OMA) fue el que presentó mayor crecimiento para las plántulas con los dos hongos simbiotes.

Palabras claves: Orquídea. Micorriza. Simbiosis. *Ceratobasidium*. *Sebacina vermífera*. Murashige & Skoog. Agar avena. *In vitro*. *Ex vitro*.

ABSTRACT

The fungus-orchid symbiosis (mycorrhiza) is the interaction between the hyphae of a fungus species and the roots of a plant, forming a structure through which exchange of water, nutrients and growth regulators take place. This symbiosis has allowed orchids to grow and adapt to different types of habitats.

In the present study, seedlings of *Epidendrum* sp. mycorrhizae with two fungi, *Sebacina vermífera* and *Ceratobasidium* sp., were used to study the *in vitro* and *ex vitro* growth of orchids, using three different culture medium. The study was carried out in the Orchid garden of the Chemical Sciences Faculty of the University of Cuenca and seedlings from the project "Study of the symbiotic relationship of orchid-mycorrhiza in the Province of Azuay, Ecuador" (DIUC XIV-16)" were used. The Murashige & Skoog Modified banana medium (Modified MS) and Oat Meal Agar (OMA) medium were prepared for the *in vitro* culture; and substrate (fine pine bark, *Sphagnum* moss and limestone) for the *ex vitro* culture. The viability and growth of the orchid were evaluated in the three culture medium, with the two types of mycorrhizal fungi.

The results showed that the medium that allowed an optimal viability is Oat Meal Agar (OMA) for mycorrhizal seedlings with *Sebacina vermífera* (86%) and with *Ceratobasidium* sp. (73%). On the contrary, the medium with the lowest percentage of viability for *Sebacina vermífera* was substrate with 59% and for *Ceratobasidium* sp. was the MS Modified banana medium with 22%.

The *in vitro* growth was higher than the *ex vitro* growth, being the Murashige and Skoog Modified banana medium the one that presented the lower growth, but greater homogeneity of the seedlings. The Oat Meal Agar (OMA) medium was the biggest growth for the seedlings with the two symbiotic fungi.

Key words: Orchid. Mycorrhiza. Symbiosis. *Ceratobasidium*. *Sebacina vermífera*. Murashige & Skoog. Oat Meal Agar. *In vitro*. *Ex vitro*.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	7
CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR	8
CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	9
CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR	10
CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	11
DEDICATORIA	12
AGRADECIMIENTOS	13
INTRODUCCIÓN.....	14
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
CAPÍTULO I	16
Marco teórico.....	16
1.1 Orquídeas.....	16
1.1.1 Generalidades	16
1.1.2 <i>Epidendrum</i>	17
1.1.3 <i>Epidendrum secundum</i> Jacq.	18
1.2 Micorrizas como factor promotor del crecimiento vegetal	19
1.2.3 Hongos involucrados en la formación de micorrizas	20
1.3 Cultivos <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> en orquídeas.....	22
1.3.1 Cultivo <i>in vitro</i>	22
1.3.2 Cultivo <i>ex vitro</i>	23
1.4 Medios de cultivo utilizados para la propagación de las orquídeas	24
1.4.1 Medio Agar Avena (OMA)	24
1.4.2 Medio Murashige & Skoog Modificado de banano (MS Modificado)	25
1.4.3 Sustratos.....	25



1.4.4 Aclimatación para cultivo en sustrato.....	25
2. Materiales y métodos	26
2.1 Área de estudio y muestreo	26
2.2 Materiales	26
2.2.1 Medios de cultivo para ensayos <i>in vitro</i>	26
2.2.2 Medio de cultivo para ensayos <i>ex vitro</i>	26
2.3 Métodos	26
2.3.1 Trasplante de plántulas micorrizadas y evaluación del crecimiento en dos medios <i>in vitro</i> y sustrato <i>ex vitro</i>	26
2.3.2 Evaluación de la viabilidad y crecimiento de plántulas	27
2.3.3 Medición de la altura alcanzada por las plántulas micorrizadas.....	28
2.3.4 Análisis estadístico.....	28
CAPÍTULO III	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
3.1 RESULTADOS.....	29
3.2 DISCUSIONES	33
CONCLUSIONES	35
RECOMENDACIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXOS	42
ANEXO A. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	42
ANEXO A1. Medio Agar avena (OMA)	42
ANEXO A2. Medio Murashige Skoog (MS) Modificado de banano	42
ANEXO A3. Sustrato.....	43
ANEXO B. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE PLÁNTULAS	43
ANEXO C. DATOS DE CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LAS PLÁNTULAS OBTENIDAS DURANTE TODO EL ESTUDIO, MENSUAL Y FINAL.....	49
GLOSARIO.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios de germinación <i>in vitro</i> de la Semilla de Orquídea	16
Figura 2. Hongo <i>Ceratobasidium</i> sp..	21
Figura 3. Hongo <i>Sebacina</i> vermífera.	22



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Figura 4. Frascos con plántulas micorrizadas con <i>Ceratobasidium</i> sp en medio MS Modificado.....	43
Figura 5. Frasco con plántulas micorrizadas con <i>Ceratobasidium</i> sp en medio OMA.	44
Figura 6. Medición de plántulas micorrizadas con <i>Ceratobasidium</i> sp en medio MS Modificado.....	44
Figura 7. Medición de plántulas micorrizadas con <i>Ceratobasidium</i> sp de medio OMA.	45
Figura 8. Frascos con plántulas micorrizadas con <i>Sebacina</i> vermífera en medio MS Modificado.....	45
Figura 9. Frascos con plántulas micorrizadas con <i>Sebacina</i> vermífera en medio OMA.	45
Figura 10. Medición de plántulas micorrizadas con <i>Sebacina</i> vermífera de medio MS Modificado.....	46
Figura 11. Medición de plántulas micorrizadas con <i>Sebacina</i> vermífera de medio OMA..	46
Figura 12. Maceta con plántulas micorrizadas con <i>Ceratobasidium</i> sp.en sustrato. ...	47
Figura 13. Medición de plántulas micorrizadas con <i>Ceratobasidium</i> sp en sustrato....	47
Figura 14. Maceta con plántulas micorrizadas con <i>Sebacina</i> vermífera en sustrato. ...	48
Figura 15. Medición de plántulas micorrizadas con <i>Sebacina</i> vermífera en sustrato..	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N.1. Descripción de los cultivos usados en el estudio.	26
Tabla N.2. Porcentaje mensual de viabilidad de plántulas micorrizadas con <i>Sebacina</i> vermífera.	29
Tabla N.3. Porcentaje mensual de viabilidad de plántulas micorrizadas con <i>Ceratobasidium</i> sp.	29
Tabla N.4. Porcentaje total de viabilidad de plántulas micorrizadas con <i>Sebacina</i> vermífera y <i>Ceratobasidium</i> sp.....	30
Tabla N.5. Promedios mensuales del crecimiento de las plántulas micorrizadas con <i>Sebacina</i> vermífera.	30
Tabla N.6. Datos mensuales del crecimiento de las plántulas micorrizadas con <i>Ceratobasidium</i> sp.	31
Tabla N.7. Altura promedio, mínimos y máximos en las plántulas micorrizadas con <i>Sebacina</i> vermífera.	31

Daniela Niveló Vásquez
Carla Rojas Pallashco



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla N.8. Altura promedio, mínimos y máximos en las plántulas micorrizadas con <i>Ceratobasidium</i> sp.	32
Tabla N.9. Registro de las medidas de crecimiento de las plántulas en los tres medios de cultivo.	49
Tabla N.10. Registro de las medidas de crecimiento de las plántulas en los tres medios de cultivo.	51
Tabla N.11. Registro de la supervivencia de las plántulas en los tres medios de cultivo.	53
Tabla N.12. Registro de la supervivencia de las plántulas en los tres medios de cultivo.	54
Tabla N.13. Registro de la supervivencia de las plántulas en los dos medios de cultivo.	55
Tabla N.14. Registro de la supervivencia de las plántulas en los tres medios de cultivo.	56
Tabla N.15. Registro de la supervivencia de las plántulas en los tres medios de cultivo.	57
Tabla N.16. Registro de la supervivencia de las plántulas en los dos medios de cultivo.	58

ÍNDICE DE GRÁFICOS


Gráfico N.1. Variación de crecimiento total de plántulas micorrizadas con <i>Sebacina vermífera</i> en los tres medios de cultivo.	32
Gráfico N.2. Variación de crecimiento total de plántulas micorrizadas con <i>Ceratobasidium</i> sp. en los tres medios de cultivo.	33

**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional**

Ana Daniela Niveló Vásquez en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de un medio óptimo para el crecimiento in vitro y ex vitro de orquídeas del género *Epidendrum* micorrizadas", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, Enero 2019



Ana Daniela Niveló Vásquez

0104750302



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Cláusula de Propiedad Intelectual

Ana Daniela Niveló Vásquez, autora del trabajo de titulación "Evaluación de un medio óptimo para el crecimiento in vitro y ex vitro de orquídeas del género *Epidendrum* micorrizadas", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, Enero de 2019

Ana Daniela Niveló Vásquez

0104750302



UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional**

Carla Roberta Rojas Pallashco en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de un medio óptimo para el crecimiento in vitro y ex vitro de orquídeas del género *Epidendrum* micorrizadas", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, Enero de 2019



Carla Roberta Rojas Pallashco
0106056393

Cláusula de Propiedad Intelectual

Carla Roberta Rojas Pallashco, autora del trabajo de titulación "Evaluación de un medio óptimo para el crecimiento in vitro y ex vitro de orquídeas del género *Epidendrum* micorrizadas", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, Enero de 2019



Carla Roberta Rojas Pallashco

0106056393

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios, por darme la fortaleza para cumplir mis metas.

A mis amados padres, Anita y Ángel por ser mí apoyo, mi guía y estar conmigo en todo momento.

A mi hermana, Carolina por el aliento y motivación que siempre me ha brindado.

A mi sobrino querido, Andrés, a quien quiero dar ejemplo de superación y constancia.

A mi novio Agustín, por ser una persona especial en mi vida y por estar conmigo en este largo camino.

A mi familia por todo el apoyo que me han dado constante e incondicionalmente.

A mis amigos y amigas, que han sido parte fundamental durante toda la carrera universitaria.

Daniela

En primer lugar, a Dios, por ser fortaleza para conseguir todos mis anhelos.

A mis amados padres Susana y Alfonso que, con su amor, paciencia y esfuerzo, me han motivado a perseguir siempre mis sueños, por más difíciles y absurdos que hubiesen podido parecer.

A mis hermanos Fabián, Miguel y Rodrigo y mi hermana Silvia que han sido siempre mi apoyo y bendición desde que éramos niños.

A mis amadas sobrinas Doménica y Sofía que, con sus cariños llenan mi vida de constante alegría.

A mi amado esposo Ramiro, que a lo largo de este difícil pero maravilloso camino, nunca soltaste mi mano y pude avanzar a tu lado, siempre fuiste mi pilar en mis momentos más tormentosos y la primera persona que siempre confió en mí.

A mi amada y perfecta hija Paula Camila, tú, amor chiquito eres la luz de mi vida, mi todo, mi ángel, mi mayor tesoro y sobre todo mi fuente de inspiración para seguir adelante todos los días.

Carla

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme salud, vida e iluminarme en todo momento para poder alcanzar una meta más en mi vida.

A mis padres que son la bendición más grande que tengo.

A mi directora de tesis Dra. Raffaella Ansaloni por todo su apoyo y confianza depositada para cumplir con este proyecto.

A mi asesora Dra. Mónica Narváez, por su apoyo, disponibilidad y asesoramiento durante el desarrollo de los ensayos realizados en el Laboratorio del Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

A mi amiga Carla, por su esfuerzo, dedicación y apoyo durante el periodo universitario y más aún durante el desarrollo de nuestra tesis.

Daniela

A Dios por ser mi guía en cada paso que doy y sobre todo mi fuerza durante toda mi vida.

A mis padres, por ser mi ejemplo y apoyo incondicional.

A mi directora de tesis Dra Raffaella Ansaloni por toda su paciencia y esfuerzo y conocimientos entregados para poder cumplir con este proyecto.

A mi asesora de tesis Dra Mónica Narváez, por todo su profesionalismo demostrado en este proyecto, gracias porque más que una asesora fue una amiga conmigo.

A mi amiga Daniela, por su sincera amistad, esfuerzo y apoyo brindado durante los años de carrera universitaria y mucho más para que juntas consigamos nuestro tan anhelado sueño.

Carla

INTRODUCCIÓN

Ecuador es el país más biodiverso del mundo por unidad de área. Posee más de 17.058 especies de plantas vasculares, o plantas con flor, como lo señala el Cuarto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2013).

El país posee cuatro de las cinco subfamilias de orquídeas existentes a escala mundial, se han reportado 4.032 las especies de esta familia botánica, de las cuales 1.714 especies son endémicas (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2013).

Sin embargo, el acelerado proceso de deforestación motivado por la tala indiscriminada de bosque primario, la explotación del petróleo, la minería y la utilización del suelo destinado a monocultivos, ha ocasionado que se pierda gran parte del hábitat natural de estas plantas y por ende la desaparición de un importante número de especies en estado natural (Narváez, 2014).

Otro problema que se enfrenta para poder conservar las orquídeas es su limitada capacidad de germinación, debido a que presentan un escaso almacenamiento nutritivo para el embrión, por lo que para germinar necesita de un hongo micorrízico, generalmente del género-forma *Rhizoctonia* (Narrea, 2006).

La germinación *in vitro* se formula como una opción de reproducción eficaz de orquídeas a partir de semillas; soluciona casos de inhibición total de la germinación, reduce el tiempo y homogeniza la germinación (López & González, 2006). Además, al realizar ésta sin emplear medios de cultivo enriquecidos es posible solamente a través de la micorrización de las semillas con hongos aislados de las raíces de orquídeas (Zettler & Corey, 2018). En los programas de conservación *ex situ*, la germinación de semillas permite incrementar la variabilidad genética de los recursos vegetales y no solamente producir clones como en el caso de cultivos a partir de tejido (Damon, 2017).

Este proyecto plantea evaluar el medio de cultivo más apropiado para el crecimiento tanto *in vitro* como *ex vitro* de orquídeas germinadas *in vitro* con micorrizas del género *Epidendrum*, mediante la evaluación del porcentaje de viabilidad y crecimiento de las plántulas en los medios nutritivos Agar avena (OMA), Murashige & Skoog Modificado de banano (MS Modificado) y sustrato compuesto por corteza de pino fino, musgo tipo *Spagnum*. y piedra caliza finamente desmenuzados; en el estudio se define esta mezcla de manera general como sustrato de siembra. También se valoró el efecto de los hongos



UNIVERSIDAD DE CUENCA

micorrízicos, empleando plántulas germinadas en presencia de *Sebacina vermífera* y otras germinadas en presencia de *Ceratobasidium sp.*

El estudio se inició a partir de plántulas germinadas simbióticamente en medio Agar avena en estadio 5 (protocormo con primeras hojas).

La presente investigación aporta información de base para garantizar el crecimiento de plántulas de orquídeas micorrízicas del género *Epidendrum*, tanto *in vitro* como en ambiente *ex vitro*, siendo el primer estudio enfocado a la etapa post germinación de plántulas germinadas simbióticamente.

HIPÓTESIS

Las plántulas obtenidas de semillas de orquídeas del género *Epidendrum*, provenientes del proyecto “Estudio de la relación simbiótica orquídea- micorriza en la Provincia del Azuay, Ecuador” (DIUC XIV-16), que fueron germinadas simbióticamente con dos tipos de hongos, *Ceratobasidium sp.* y *Sebacina vermífera*; experimentarán diferencias de crecimiento, desarrollo y adaptación en medios de cultivo OMA, MS Modificado de banano y sustrato, presentando además diferencias de comportamiento según el hongo micorrízico.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los medios de cultivo OMA, MS modificado de banano y sustrato para la viabilidad y el crecimiento de plántulas de orquídeas del género *Epidendrum* micorrizadas con dos diferentes hongos simbios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la viabilidad de plántulas micorrizadas en medio de cultivo base estándar y *ex vitro*.
- Evaluar la tasa de crecimiento y desarrollo de las orquídeas micorrizadas en los tres medios de cultivo.
- Evaluar la eficacia de los dos hongos simbios sobre el crecimiento de las orquídeas micorrizadas.

CAPÍTULO I

Marco teórico.

1.1 Orquídeas.

1.1.1 Generalidades

A la familia Orchidaceae, pertenecen alrededor de 20.000 especies de plantas con flores (Dressler, 2003).

Estas plantas poseen características únicas como la fusión de la porción femenina de la flor (pistilos) con la masculina (estambres), los cuales se mantienen unidos en una estructura llamada columna o gynostemio que se encuentran en el centro del labelo (Santos, 1997).

Generan una gran cantidad de semillas muy pequeñas y solo una porción limitada de éstas germinan debido a que casi no poseen sustancias de reserva y que además requieren ser colonizadas por un determinado tipo de hongo, el cual les proporcionará los nutrientes durante la primera fase de desarrollo (Santos, 1997).

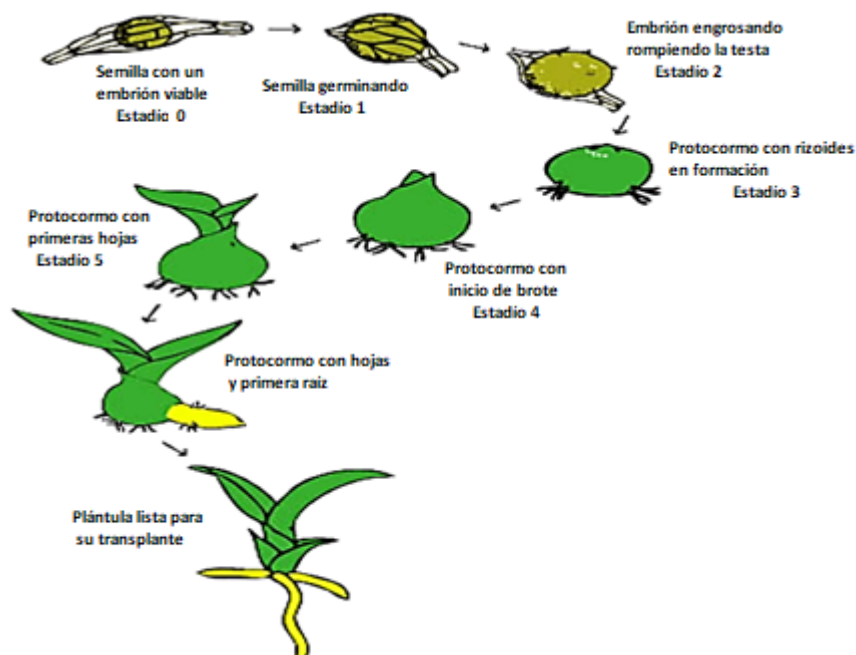


Figura 1. Estadios de germinación in vitro de la Semilla de Orquídea

Fuente: (Seaton & Ramsay, 2009)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La familia Orchidaceae es cosmopolita, ya que se distribuye en todo el mundo; especialmente en regiones tropicales y subtropicales, excepto en regiones polares y desiertos extremos.

Se clasifican en cuatro tipos de orquídeas por su forma de vida:

- Epífitas: son aquellas que viven sobre otras plantas.
- Litófilas o rupícolas: viven sobre las rocas.
- Terrestres: viven directamente sobre el suelo.
- Saprófitas: no realizan fotosíntesis ya que poseen un sustrato previamente elaborado por las plantas (Santos, 1997).

Las raíces de las orquídeas epífitas presentan dos sistemas radiculares: uno radical modificado por medio de una cubierta de células esponjosas llamado "velamen", el cual le permite absorber nutrientes del aire, del agua de lluvia y los dispuestos en los troncos de los árboles, el otro es un sistema avanzado de almacenamiento de agua y nutrientes llamados "pseudobulbos", que contribuyen a la supervivencia y reproducción (Santos, 1997).

Las hojas de las orquídeas poseen diversidad de formas, en algunas especies son carnosas y funcionan como órganos de reserva, mientras que en otras están ausentes o se caen en determinados períodos (Santos, 1997).

La reproducción vegetativa o asexual de las orquídeas se realiza mediante la división de una planta, para lo cual es necesario que la planta madre tenga al menos ocho pseudobulbos y la porción de corte debe tener mínimo cuatro de éstos (Santos, 1997).

Para la reproducción por semilla en condiciones naturales es necesario esparcirlas cerca de las raíces de plantas viejas, para que al germinar puedan asociarse con el hongo apropiado (Santos, 1997).

1.1.2 *Epidendrum*

El nombre *Epidendrum* viene del griego *epi* (sobre) y *dendron* (árbol), debido al hábito epífito de las primeras especies descritas. Es uno de los géneros que poseen mayor número de especies dentro de la familia Orchidaceae (Portilla, 2007).

Es un género neotropical formado por al menos 1.500 especies distribuidas desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, desde el nivel del mar hasta los 3600 m de altura (Portilla, 2007). En el Ecuador existen alrededor de 452 especies, entre las



UNIVERSIDAD DE CUENCA

más comunes de éste género están *E. bracteolatum*, *E. jameisonis*, *E. bifalce* y *E. spicatum* (Banks, 2006).

La mayoría de especies de *Epidendrum* son epífitas y litofíticas. Las epífitas generalmente se encuentran en el humus de ramas y hojas. Además, su biomasa se concentra en el sistema radical, y en los tallos pueden requerir hasta tres años para alcanzar la madurez y producir flores (Pridgeon, Cribb, & Rasmussen, 2006).

Algunas especies se encuentran en madera en ambientes oscuros y húmedos. Estas especies son generalmente pequeñas, epífitas de corteza, con tejidos para el almacenamiento de agua. Sus raíces tienen orientación plagiotrópica, y su floración es lentamente sucesiva. El racimo cesa el desarrollo si la flor es polinizada, ya que así maximiza los recursos, como respuesta a la adaptación a condiciones de oscuridad (Pridgeon, Cribb, & Rasmussen, 2006).

La mayoría de las especies de *Epidendrum* crecen en los árboles, otras en rocas o en lugares donde el suelo está cubierto por musgo espeso. Necesitan ser cultivadas en un sustrato compuesto preferiblemente con musgo, cortezas y fibras de helechos (Camargo, 2002).

1.1.3 *Epidendrum secundum* Jacq.

1.1.3.1 Clasificación botánica

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Orchidales
Familia: Orchidaceae
Subfamilia: Epidendroideae
Tribu: Epidendreae
Género: *Epidendrum*
Especie: *secundum*

1.1.3.2 Distribución

En el Ecuador se encuentra distribuida en diversos sectores; en la provincia de Loja habitan en ecosistemas desde los 200 a 3500 m. s.n.m a temperaturas desde los 8 a 26 °C. También se localizan en las provincias de Azuay (2400 m. s.n.m), Cañar (1700-1900 m. s.n.m), Carchi (1200 m s.n.m), Manabí (300 m s.n.m), Pastaza (1000 m. s.n.m), Pichincha (1600 m. s.n.m) y Tunguragua (2000 m s.n.m) (Dodson, 2003).

Daniela Niveló Vásquez
Carla Rojas Pallashco



1.1.3.3 Características

Epífita, algunas veces litófito, hasta de 1 m. de alto. Especie con tallos similares a la caña o pseudobulbos, sus hojas son planas, el terminal de inflorescencia lateral, las flores en el ápice en un corto racimo subumbeliforme. Posee ovario pedicelado, sépalos y pétalos obovados, su labelo soldado a la columna, lóbulos laterales y medio, cápsula ovoidea (Dodson, 2002).

1.2 Micorrizas como factor promotor del crecimiento vegetal

Las orquídeas forman asociaciones simbióticas de tipo micorrizas (del griego *mycos*: hongo; *rrihos*: raíz) (Ordoñez, Díez, & Otero, 2012).

En el ecosistema los hongos micorrízicos son importantes en la acumulación de carbono gracias a su glicoproteína, glomalina que le confiere estabilidad a los agregados de suelo (Seguel, Rubio, Carrillo, Espinosa, & Borie, 2008).

Los hongos micorrízicos poseen hifas, las cuales contribuyen en la absorción de la raíz, ya que se propagan fuera de los límites de la zona rizosférica. Permiten el paso de agua y nutrientes como el fósforo, nitrógeno, azufre, potasio, calcio, zinc, hierro, cobre y carbono (Etayo & De Miguel, 1998).

Existen varios tipos de micorrizas:

- **Ectomicorrizas:** en donde el micelio invade la raíz sin ingresar en el interior de las células.
- **Endomicorrizas:** el micelio invade la raíz, inicialmente es intercelular; luego ingresa en el interior de las células radicales, desde la rizodermis hasta las células corticales.
- **Endomicorrizas orquidioides o de ovillo:** asociaciones que penetran dentro de las células de las orquídeas en bobinas de hifas (ovillos); las micorrizas generalmente son basidiomicetos en alianza con el género- forma *Rhizoctonia* (Smith & Read, 2002).

El género-forma *Rhizoctonia* presenta en la fase asexual (anamorfo), en relación con la hifa principal un micelio estéril incoloro, células largas y ramificaciones en ángulo recto. En la fase sexual (teleomorfo), abarca los géneros *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Sebacina* y *Thanatephorus*, los mismos que se diferencian por sus estructuras reproductivas formadas por basidiocarpos generadores de basidiosporas (Mosquera, Bayman, & Otero, 2010).



Además, el género *Rhizoctonia* en medios de cultivo presenta un micelio estéril, en colonias jóvenes (1-10 días) es de color blanco y en colonias de más de 20 días de color entre amarillo y café (Kottke & Suárez, 2009; Sneh, Burpee, & Ogoshi, 1998). Aunque, el micelio por lo general no presenta características diferenciales suficientes que proporcionen la identificación a nivel específico (Sneh, Burpee, & Ogoshi, 1998).

La red de hifas o micelio externo tiene acceso a abundantes fuentes de carbono en el suelo que pueden ser asimilados y transportados a la orquídea. El hongo formador de micorriza puede obtener un abastecimiento continuo de fotosintatos a través de la asociación existente con otras plantas del sistema (Selosse, Richard, He, & Simard, 2006).

Los pelotones intracelulares que son las estructuras micelares de las micorrizas, tienen un periodo de vida limitado en la interacción de la micorriza, la hifa se convierte en un sistema desordenado; en donde sus paredes se adelgazan. En el estado final las paredes del hongo forman una masa irregular (Dijk, Willems, & Van Andel, 1997). Durante este proceso las células de la planta se mantienen vivas y activas y pueden ser recolonizadas por hifas que aparentemente sobrevivieron a los procesos de lisis o son colonizadas de nuevo por hifas de células adyacentes (Breddy, 1991). Como consecuencia de la colonización, lisis y la transferencia de nutrientes, se produce el crecimiento de la planta (Arditti, 2009).

Las raíces de especies terrestres están por lo general muy colonizadas (Smith S & Read D, 2002), mientras que en orquídeas epifitas llegan a estar colonizadas sólo después de entrar en contacto con el sustrato. Esto sugiere que el hongo no se transmite verticalmente en el material vegetal y que es necesaria su inoculación para el establecimiento de la simbiosis (Rasmussen, 2002).

1.2.3 Hongos involucrados en la formación de micorrizas

1.2.3.1 *Ceratobasidium sp*

Colonias algodonosas, de color blanco a amarillo-anaranjado, rápida tasa de crecimiento (0,2-0,5 mm/hr en PDA a 25°C), y abundante micelio aéreo, algunas veces exponiendo anillos concéntricos o zonas. Hifas amplias (4-7 μ m), con ramificaciones en ángulos amplios, binucleados. Células monilioides en forma de barril, ampliamente adheridas, grandes (15-25 x 7-11 μ m), formando abundantes esclerocios dando a las colonias un aspecto granular. Basidia conocida por formarse ocasionalmente en hifas



UNIVERSIDAD DE CUENCA

vegetativas. Generalmente resultado positivo para polifenol oxidasa (Zettler & Corey, 2018).

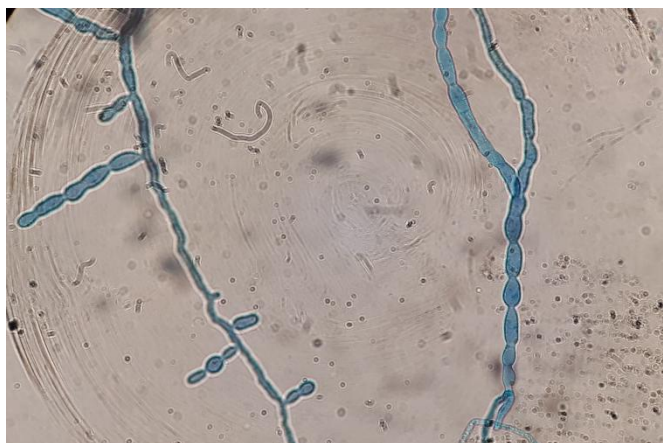


Figura 2. Hongo *Ceratobasidium* sp.; Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.

1.2.3.2 *Sebacina vermífera*

Se aisló por primera vez en la orquídea australiana *Cytostylis reniformis*, pertenece al orden basidiomiceto *Sebacinales* (subgrupo B). Constituida por taxones que están distribuidos ubicuamente que son basales en los Agaricomycetos con capacidades micorrizas (Barazani, Benderoth, Groten, Kuhlemeier, & Baldwin, 2005; Lahrmann, 2013)

El género *Sebacina* se caracteriza por tener micelio denso, sus colonias son de color crema y pasado los 30 días, se vuelven anaranjadas. Sus hifas son hialinas de paredes delgadas y estrechas (<5 µm ancho) (Zettler & Corey, 2018).

Durante la colonización de raíces, se pueden identificar distintas etapas de desarrollo. La infección se inicia a partir de clamidosporas, que al germinar forman una red de hifas en las raíces dentro de las 36 horas posteriores a la inoculación, el hongo coloniza áreas pequeñas; las hifas ocupan los tejidos corticales y rizodermas después de 5 días, pero el hongo nunca procede más allá de la endodermis o el tejido meristemático central (Lahrmann, 2013).

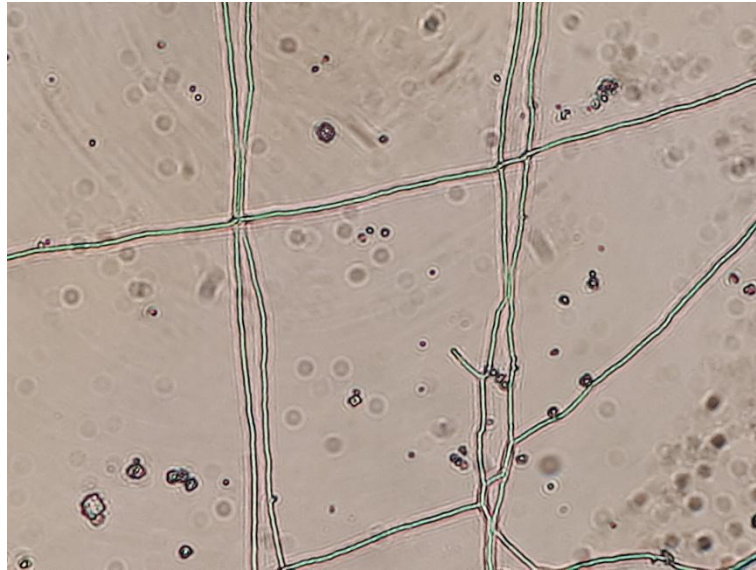


Figura 3. Hongo *Sebacina vermífera*; Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.

1.3 Cultivos *in vitro* y *ex vitro* en orquídeas

1.3.1 Cultivo *in vitro*

Cultivo *in vitro* significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un entorno artificial (Mroginski & Roca, 1991).

Las orquídeas presentan factores externos e intrínsecos que restringen su propagación sexual y la variación genética que en ellas se puede presentar. Dichos factores se asocian con el pequeño tamaño de las semillas y sus limitadas reservas alimenticias, lo cual las conduce a formar asociaciones simbióticas esencialmente con micorrizas para obtener su germinación, que en circunstancias naturales puede llegar a ser solamente de un 2-3% (Luan, Thien, Khiem, & Nhut, 2006).

Las técnicas *in vitro* se muestran como una estrategia para la conservación *ex situ* de orquídeas, ya que posibilita la germinación de todas las semillas de las cápsulas de las orquídeas que se encuentren bien maduras, facilitando que se reproduzcan un gran número de plantas en un corto periodo de tiempo, además se disminuye en un 85% aproximadamente el tiempo de germinación (Pedroza, Serrato, & Castaño, 2010).

La conservación *in vitro* aporta varias ventajas, como la obtención de material libre de patógenos, tasas de multiplicación altas, suministro constante de plantas a los productores, bajo costo en la producción, mantenimiento de la fidelidad genética del

Daniela Niveló Vásquez
Carla Rojas Pallashco



material. Existen ciertas desventajas como la pérdida de material genético por contaminaciones, dependencia de mano de obra calificada y que el material puede destruirse en caso de un siniestro (Mohan, 2011; Iriondo, 2011).

La germinación de las orquídeas epífitas, se puede dar en un corto periodo de tiempo (dos semanas) o puede durar algunos meses. El tiempo promedio es cuatro semanas. Los signos iniciales de germinación se pueden observar cuando las semillas embeben agua y se engruesan; seguido por una variación de color en las semillas, que luego cambia a verde cuando comienza a producir clorofila. Al momento que la semilla de una orquídea germina en la luz, en lugar de producir una hoja y una raíz inicial, se forma una pequeña esfera constituida por células verdes que adopta el nombre de protocormo; a medida que éste crece, en su parte inferior se presentan pequeños pelos radicales, luego de que se reúne suficiente materia orgánica en la parte superior, se exhibe el primer brote; por lo cual desde ésta estructura se formarán las primeras hojas y raíces (Seaton & Ramsay, 2009).

La diferencia entre el cultivo *in vitro* con medio enriquecido y el cultivo *in vitro* con hongos micorrízicos radica en que los medios de cultivo para la germinación asimbiótica poseen gran contenido de azúcares, nutrientes y las plántulas tardan meses para establecerse. Dicha composición coloca a las plántulas vulnerables a la contaminación fúngica. Por lo tanto, la inoculación de las semillas con un hongo micorrízico ayuda a eludir el crecimiento de otros hongos que las podrían contaminar (Porrás & Bayman, 2007).

La germinación simbiótica de orquídeas resulta ser eficaz en la propagación de diferentes especies (Rangel, 2004). La adición de un hongo micorrízico idóneo a las semillas en su proceso de germinación va a disminuir significativamente el tiempo en el que las plántulas se desarrollan (Ortega, Sandoval, Ramos, & Chávez, 2005). Es así que la simbiosis va a originar plantas mucho más resistentes que tolerarán la aclimatación *ex vitro* de una mejor forma (Castillo, 2002 ; Ortega et al., 2005). Por lo tanto para que la germinación simbiótica sea altamente efectiva, ésta demanda poseer conocimiento especializado sobre el manejo de los endófitos adecuados (Rasmussen, 1995).

1.3.2 Cultivo *ex vitro*

Constituye el cambio gradual de las condiciones ambientales de las plántulas que fueron cultivadas *in vitro*; es la transferencia de las plántulas de un ambiente aséptico cerrado



a medio o sustrato expuesto al ambiente, con menor humedad relativa y mayor intensidad de luz (Indacochea, Parrales, Castro, Vera, & Gabriel, 2017).

Después de la germinación se forma una masa de células denominada protocormo (PLBs), éstos se diferencian en una región apical, que tiene pequeñas células que constituyen el ápice de brote y la parte basal conformada por grandes células parenquimatosas que funciona como un depósito orgánico. (Montes, Lalama, Echeverría, & Torres, 2016)

Además, en los primeros estados de desarrollo poseen brotes de hojas y raíces adventicias. Por ejemplo se ha observado que en *Aerides crispum*, posee estructuras globulares originadas en las capas subepidérmicas del protocormo, y constan de células pequeñas, que luego de desarrollarse forman una protrusión (Nava, Jiménez, Sánchez, Arenas, & Ventura, 2011).

Las plántulas resultantes del cultivo *in vitro* realizan fotosíntesis, pero al transferirse a condiciones *ex vitro* para su aclimatación, disminuyen el desarrollo y rendimiento fotosintético, debido a cambios de las condiciones del cultivo *in vitro* como son la alta humedad relativa, baja intensidad luminosa y la baja concentración de CO₂, todo esto conlleva a que las plántulas tanto morfológica, anatómica y fisiológicamente no se desarrollen de una manera normal, y para ello se requiere un periodo de aclimatación, para posterior iniciar con el cultivo *ex vitro* (Nava et al., 2011).

1.4 Medios de cultivo utilizados para la propagación de las orquídeas

Los medios de cultivo son soluciones acuosas en donde se encuentran disueltas sales minerales que aportan con macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co), es imprescindible para las plántulas obtener una fuente de carbono, generalmente como la sacarosa, debido a la escasa actividad fotosintética de los tejidos *in vitro*. También los medios de cultivo pueden ser enriquecidos con aminoácidos, vitaminas y reguladores del crecimiento (Damaso, 2013).

1.4.1 Medio Agar Avena (OMA)

La característica de este medio es que permite la difusión del oxígeno y nutrientes disueltos. Además, es más eficaz para el crecimiento de hongos micorrízicos que otros medios modificados (Zettler, Poulter, McDonald, & Stewart, 2007). Está constituido por un cereal, la avena que aporta azúcares, vitaminas, y agar como agente gelificante (Roca & Mroginski, 1991). Para que los elementos y compuestos presentes en la avena



sean absorbidos por la planta, la avena debe ser descompuesta, mediante su digestión por parte de los hongos micorrízicos (Zettler, Poulter, McDonald, & Stewart, 2007).

1.4.2 Medio Murashige & Skoog Modificado de banano (MS Modificado)

Este medio es importante ya que posee macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, para ayudar al crecimiento de las plántulas en los cultivos *in vitro* (Murashige & Skoog, 1962). Además, está constituido por carbón activado, azúcar, vitaminas y adicionalmente banano; que van a ser aprovechadas por las orquídeas para su crecimiento. El azúcar se utiliza como fuente de energía hasta que las plántulas produzcan clorofila y sean independientes (Roca & Mroginski, 1991).

El banano mejora el crecimiento de las plántulas de orquídeas debido a su gran contenido de sustancias que aportan nutrientes a las plántulas como son el sodio, aluminio, magnesio, fósforo, potasio, zinc (Arditti, 2009).

Se toma en cuenta el pH, el mismo que debe ser de 5.6, ya que si no es el óptimo este puede afectar la disponibilidad de los nutrientes para las plántulas durante su crecimiento (Arditti, 2009).

1.4.3 Sustratos

Son materiales compuestos esencialmente de musgo, tronco de helecho arbóreo desmenuzado y corteza de pino en pequeños trozos sobre el cual la planta desarrollará sus raíces y eventualmente crecerá y florecerá. Un buen sustrato debe ser a la vez retentivo de humedad, proveedor de buena ventilación a las raíces (Altamirano, 2018).

Los sustratos más usados para el cultivo de orquídeas son: musgo serrano (amarillo), musgo verde de roca y musgo blanco, además pueden utilizar corteza de pino, carbón vegetal, grava volcánica, piedra liviana o arcilla expandida (Altamirano, 2018).

1.4.4 Aclimatación para cultivo en sustrato

La aclimatación consiste en el cambio de ambiente de las plántulas que se encuentran en un ambiente estéril (cultivo *in vitro*) a un ambiente con menor humedad relativa, mayor intensidad lumínica y un ambiente séptico (Debergh P & Zimmerman R, 1991). Las plántulas van a transformarse de un estado semiheterótrofo a uno autótrofo con cambios tanto fisiológicos como morfológicos, además van a estar expuestas a una mayor probabilidad de contaminación por plagas y enfermedades (Díaz, Namur, Bollati, & Arce, 2010).

CAPÍTULO II

2. Materiales y métodos

2.1 Área de estudio y muestreo

Se utilizaron 26 cajas con plántulas del género *Epidendrum* micorrizadas (*Sebacina vermífera* y *Ceratobasidium sp.*) germinadas y crecidas hasta el estadio 5 (Figura 1); las plántulas provienen del proyecto “Estudio de la relación simbiótica orquídea – micorriza en la Provincia del Azuay, Ecuador” (DIUC XIV-16), del Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay.

2.2 Materiales

2.2.1 Medios de cultivo para ensayos *in vitro*

Con el fin de evaluar la viabilidad de plántulas en condiciones *in vitro* se utilizó los medios Agar avena (OMA) y Murashige Skoog Modificado de banano. Las formulaciones se describen en el ANEXO A.

2.2.2 Medio de cultivo para ensayos *ex vitro*

El sustrato está constituido por seis partes de pino fino, tres partes de musgo tipo *Sphagnum* y una parte de piedra caliza finamente desmenuzados, se coloca en una maceta plástica pequeña con perforaciones la cual posee en el fondo una capa de poliestireno que ayuda a la aireación del sustrato y facilita el drenaje.

2.3 Métodos

2.3.1 Trasplante de plántulas micorrizadas y evaluación del crecimiento en dos medios *in vitro* y sustrato *ex vitro*

Para evaluar el medio óptimo de crecimiento con los hongos micorrízicos *Sebacina vermífera* y *Ceratobasidium sp.*, se diseñó un ensayo, con tres diferentes tratamientos.

Tabla N. 1. Descripción de los cultivos usados en el estudio.

TRATAMIENTO	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
1	MS Modificado	Plántulas de <i>Epidendrum</i> en estadio 5 sembradas en medio Murashige & Skoog Modificado de banano
2	OMA	Plántulas de <i>Epidendrum</i> en estadio 5 sembradas en medio Agar avena
3	SUSTRATO	Plántulas de <i>Epidendrum</i> en estadio 5 sembradas en sustrato (pino fino, musgo tipo <i>Sphagnum</i> y piedra caliza)

Los tratamientos se iniciaron con la selección de 13 cajas en medio Agar avena + *Sebacina vermífera* y 13 cajas en medio Agar avena + *Ceratobasidium sp* con plántulas del género *Epidendrum* en estadio 5 que necesitaban ser replantadas, debido a que el espacio de las cajas Petri que las contenían no permitían un mayor crecimiento; las plántulas contenidas en cada caja Petri se dividieron en tres partes iguales y cada tercio se sembró en los tres medios de cultivo en estudio.

Para los tratamientos 1 y 2, se sacaron las plántulas con una pequeña porción de medio de las cajas con ayuda de pinzas estériles, después con una regla se midió el tamaño que poseían y se fotografió como evidencia. Se sembraron 6 plántulas por tratamiento para evitar sobrepoblación, otorgándoles el espacio suficiente para que puedan crecer y desarrollarse. Se dejó los cultivos en la cámara de flujo laminar durante 8 días para corroborar una correcta siembra y supervisar una posible contaminación, luego de este periodo se colocó sulfato de cobre en las tapas de los frascos con éste se evitó una contaminación por hongos, después se selló con plástico film cubriendo toda la tapa; por último se colocó en el cuarto de crecimiento a una temperatura entre 23 - 25°C y humedad relativa entre 65 y 70%, hasta el momento de que las plántulas necesiten un nuevo replante.

Para el tratamiento 3, las cajas se abrieron durante 24 horas para iniciar la aclimatación, con este paso se proporcionó a las plántulas una mayor tolerancia a la baja de humedad relativa del medio ambiente a las que serán expuestas, luego de ese tiempo se extrajo las plántulas, se lavó, colocándolas en una caja Petri con agua durante 10 minutos, se secó colocando sobre papel absorbente y se midió su tamaño con una regla, se fotografió como evidencia. Se sembró 6 plántulas en medio sustrato para evitar la sobrepoblación, otorgándoles el espacio suficiente para que puedan crecer y desarrollarse. Luego se cubrió con plástico film para evitar la desecación, finalmente se colocó en el cuarto de crecimiento a una temperatura entre 23 - 25°C y humedad relativa entre 65 y 70%. Además, se realizan riegos con pulverizaciones de agua cada 3 a 4 días.

2.3.2 Evaluación de la viabilidad y crecimiento de plántulas

Por cada tratamiento se llevó a cabo un control de viabilidad de las plántulas micorrizadas en el cuarto de crecimiento a partir del número inicial de plantas, se registró la cifra de plantas viables y no viables, además se verificó la altura. Se calculó el



UNIVERSIDAD DE CUENCA

porcentaje de viabilidad en cada fecha de registro y se graficó su evolución en el tiempo. Se efectuaron también registros fotográficos y evaluaciones del crecimiento y estado de desarrollo de las plantas. (Ver **ANEXO B**)

2.3.3 Medición de la altura alcanzada por las plántulas micorrizadas

La altura de las plántulas se midió extrayéndolas, cada 30 días desde fecha de siembra, ya que este tiempo permite observar cambios en su crecimiento; esto se efectuó dentro de la cámara de flujo empleando cajas Petri y una regla.

2.3.4 Análisis estadístico

La evaluación del porcentaje de viabilidad y crecimiento se realizó mediante herramientas de estadística descriptiva. Los tratamientos 1 y 2, descritos en la Tabla 1, se realizaron con 30 repeticiones, desde el mes de mayo a julio del 2018. El tratamiento 3, para condiciones *ex vitro* se realizó con 20 repeticiones. Los datos fueron recopilados en una hoja de cálculo del software Excel®, y se calcularon medidas de posición y dispersión para analizar la tendencia de los datos obtenidos.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

Los datos obtenidos de viabilidad y crecimiento en los tres tratamientos se presentan en las siguientes tablas y gráficos.

3.1.1 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD

Tabla N. 2. Porcentaje mensual de viabilidad de plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera*.

Tratamiento	Mes 1	Mes 2	Mes 3
MS Modificado de banano	100%	95%	71%
Agar avena (OMA)	100%	99%	86%
Sustrato	100%	93%	59%

El análisis de la Tabla N. 2 indica la viabilidad mensual de las plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera*. Se observa en el primer mes el 100% de viabilidad en los tres medios de cultivo; en el segundo mes de monitoreo existe un alto porcentaje, con valores del 95%, 99% y 93% para MS Modificado de banano, Agar Avena (OMA) y sustrato respectivamente. Los porcentajes para el tercer mes revelan que Agar Avena (OMA) permite una mayor viabilidad con el 86%, seguido por MS Modificado de banano con el 71% y sustrato con el 59%, reflejando así una mayor tasa de mortalidad de las plántulas en este último.

Tabla N. 3. Porcentaje mensual de viabilidad de plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium sp.*

Tratamiento	Mes 1	Mes 2	Mes 3
MS Modificado de banano	100%	64%	22%
Agar Avena (OMA)	100%	87%	73%
Sustrato	100%	74%	63%



El análisis de la tabla N. 3 indica una viabilidad del 100% para las plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium sp.* en el primer mes con los tres medios de cultivo. En el segundo mes se observa una disminución de la viabilidad, con el 87% para el medio Agar avena (OMA), seguido de sustrato y MS Modificado de banano con el 74% y 64% respectivamente. Al tercer mes de monitoreo, el medio con mayor tasa de viabilidad es Agar avena (OMA) con el 73%, seguido de sustrato con el 63%, por ende, MS Modificado de banano el medio con menor porcentaje de viabilidad con el 15%.

Tabla N. 4. Porcentaje total de viabilidad de plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera* y *Ceratobasidium sp.*

<i>Sebacina vermífera</i>			<i>Ceratobasidium sp.</i>		
MS Modificado de banano	Agar avena (OMA)	Sustrato	MS Modificado de banano	Agar avena (OMA)	Sustrato
71%	86%	59%	22%	73%	63%

La tabla N. 4 representa la viabilidad total de las plántulas en los tres medios de cultivo al final del estudio. Se observa una alta tasa de viabilidad total en el medio Agar avena (OMA), tanto para *Sebacina vermífera* como para *Ceratobasidium sp.* con valores del 86% y 73%, respectivamente; seguido del medio MS Modificado de banano para *Sebacina vermífera* con el 71% y 63% para *Ceratobasidium sp.* en el medio sustrato.

Los medios en los cuales las plántulas presentan un menor porcentaje de viabilidad son el medio *ex vitro* para *Sebacina vermífera* con un porcentaje del 59% y el medio MS Modificado de banano con el 22% para *Ceratobasidium sp.*

3.1.2 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO

Tabla N. 5. Promedios mensuales del crecimiento de las plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera*.

Tratamiento	Mes 1 (cm)	Mes 2 (cm)	Mes 3 (cm)
MS Modificado de banano	1,2	1,5	1,5
Agar avena (OMA)	1,0	1,6	2,8
Sustrato	1,0	1,3	0,8

La tabla 5, en el mes uno refleja un crecimiento de las plántulas con el hongo *Sebacina vermífera* de 1,2 cm en el medio MS Modificado de banano y 1 cm para los medios Agar avena (OMA) y sustrato. En el mes dos, las plántulas presentan crecimiento en los medios Agar avena (OMA) con 1,6 cm, seguido del medio MS Modificado de banano con 1,5 cm y del medio sustrato con 1,3 cm. Al tercer mes presentan una mayor tasa de crecimiento en Agar avena (OMA) con 2,8 cm seguido del medio MS Modificado de banano que presenta un crecimiento de 1,5 cm.

Tabla N. 6. Datos mensuales del crecimiento de las plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium sp.*

Tratamiento	Mes 1 (cm)	Mes 2 (cm)	Mes 3 (cm)
MS Modificado de banano	1,0	0,7	0,3
Agar avena (OMA)	1,0	1,0	1,7
Sustrato	1,2	1,3	1,1

La tabla N. 6 representa el crecimiento mensual de las plántulas con el hongo *Ceratobasidium sp.* En el mes uno existe un crecimiento promedio de 1,2 cm para el medio sustrato y para los dos medios, MS Modificado de banano y Agar avena (OMA) de 1 cm. Al segundo mes se observa un mayor crecimiento en el medio sustrato con 1,3 cm, manteniéndose el medio Agar avena (OMA) con 1 cm; mientras que para el medio MS modificado de banano existe un crecimiento de 0,7 cm. Finalmente, en el tercer mes el medio con mayor crecimiento es el medio Agar avena (OMA) con un valor de 1,7 cm.

Tabla N. 7. Incremento promedio, mínimos y máximos en las plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera*.

Tratamiento	Incremento promedio \pm DE (cm)	Incremento mínimo (cm)	Incremento máximo (cm)
MS Modificado de banana	0,43 \pm 0,35	0,1	1,7



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Agar avena (OMA)	0,89 ± 0,82	0,1	4,1
Sustrato	0,24 ± 0,23	0,5	0,9

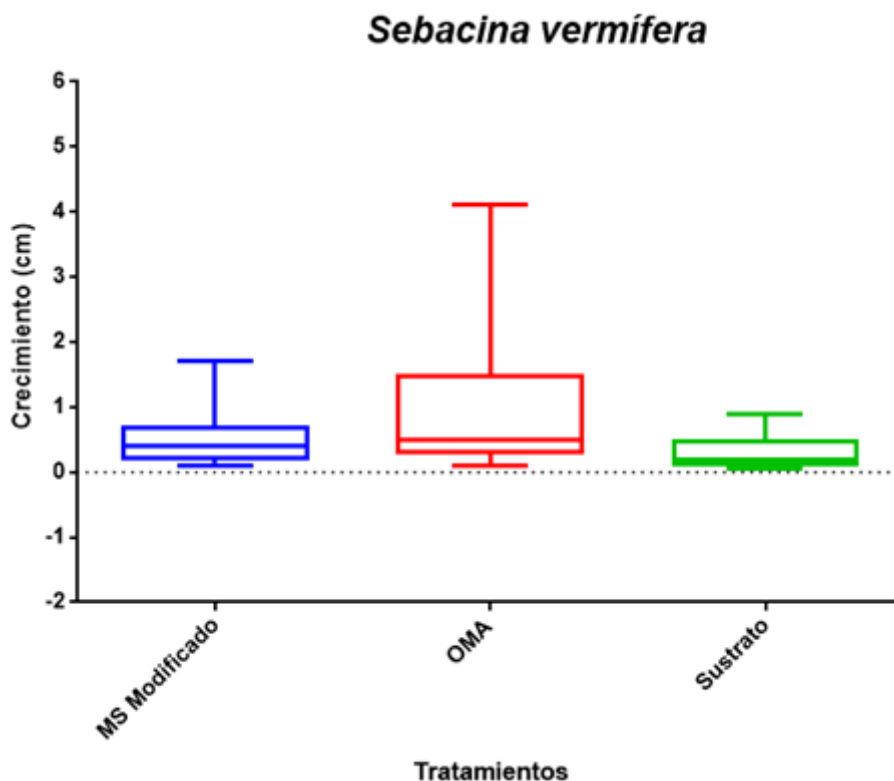


Gráfico N. 1. Variación de crecimiento total de plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera* en los tres medios de cultivo.

En la gráfica N. 1 se observa que el medio Murashige & Skoog Modificado de banano presenta menos variabilidad y por lo tanto mayor homogeneidad de crecimiento de las plántulas que en Agar avena (OMA), pero éste medio es el que presenta mayor crecimiento. Los medios *in vitro* poseen mejor crecimiento que el medio sustrato.

Tabla N.8. Incremento promedio, mínimos y máximos en las plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium sp.*

Tratamiento	Incremento promedio ± DE(cm)	Incremento mínimo (cm)	Incremento máximo (cm)
-------------	------------------------------	------------------------	------------------------



UNIVERSIDAD DE CUENCA

MS Modificado de banana	0,31 ± 0,34	0,1	1,7
Agar avena (OMA)	0,84 ± 0,84	0,1	4,1
Sustrato	0,20 ± 0,24	0,1	0,9

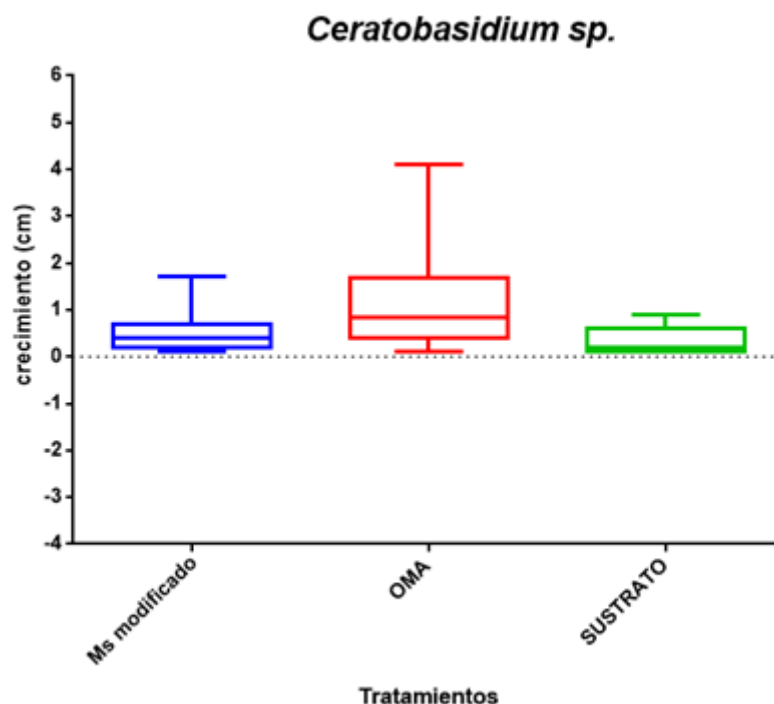


Gráfico N. 2. Variación de crecimiento total de plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium sp.* en los tres medios de cultivo.

En la gráfica N. 2 se observa que el medio Agar avena (OMA) presenta mayor crecimiento de las plántulas a pesar de tener una gran variabilidad. El crecimiento en medio sustrato no se puede comparar con el de los medios *in vitro* debido a que presentan diferentes condiciones ambientales.

3.2 DISCUSIONES

3.2.1 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS PLÁNTULAS MICORRIZADAS

En el estudio realizado, se determinó que la viabilidad es mayor en el medio Agar Avena (OMA) tanto en las plántulas micorrizadas con el hongo *Ceratobasidium sp.* como con *Sebacina vermífera*; según Rasmussen, 2002, algunas especies de orquídeas son dependientes del hongo durante toda su vida como fuente de carbono y nutrientes corroborando así que la simbiosis es muy importante para la viabilidad de las plántulas,

Daniela Niveló Vásquez
Carla Rojas Pallashco



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Además, estudios realizados han demostrado que este medio es uno de los más utilizados y da como resultado plantas micorrizadas más fuertes y resistentes a infecciones. (Arditti, 2009).

Es importante resaltar que se obtuvo el 63% de viabilidad para las plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium sp* en el medio sustrato, debido a que sus componentes aportan buena retención hídrica, lo cual coincide con el ambiente natural que esta especie prefiere, tal es el caso de sustrato húmedo y humífero en nudos de troncos o ramas de los árboles (Haussecker & Martiarena, 2016).

Además, es probable que las plántulas simbióticas crecidas *in vitro* sean más adaptables a las condiciones *ex vitro* que las plántulas asimbióticas, ya que se ha informado que los hongos micorrízicos de orquídeas facilitan la absorción de agua y nutrientes (Yoder Zettler & Stewart, 2000).

La viabilidad de las plántulas en el medio MS Modificado de banano es inferior, debido a que este es un medio estándar, utilizado para el crecimiento y desarrollo de diferentes especies de orquídeas sin relación simbiótica, que favorece por lo tanto al crecimiento desmedido del hongo, además de las plantas. Por esta razón este medio presenta una menor viabilidad.

3.2.2 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS

Con los resultados observados se determinó que el medio óptimo que permite un mayor crecimiento es Agar Avena (OMA) tanto para el hongo *Sebacina vermífera* como para *Ceratobasidium sp*, ya que las plántulas absorbieron todos los nutrientes que este medio le provee, facilitando un rápido crecimiento en relación con MS Modificado de banano y sustrato. Además, los hongos aprovechan y digieren la avena gracias a su actividad enzimática, aportando así con nutrientes necesarios que requiere la plántula; y según los reportes realizados por Koltai & Kapulnik, 2010, determina que durante la simbiosis se dan alteraciones citológicas y metabólicos entre el hongo y la planta en donde ocurren actividades enzimáticas que permiten el crecimiento y desarrollo de la plántula e inclusive sirven como mecanismos de defensa contra patógenos.

El medio Murashige & Skoog Modificado de banano permitió un crecimiento menor, aunque más homogéneo, debido a que posiblemente los nutrientes del medio favorecieron al crecimiento de todas las plántulas, incluso de algunas que no contaban con un sistema de micorrización funcionando. Además el hongo *Ceratobasidium sp*.



posee un tasa de crecimiento mucho más rápido que de las plántulas (Zettler & Corey, 2018).

El crecimiento en el medio sustrato con los dos hongos micorrízicos fue satisfactorio; a pesar de que las plántulas sembradas eran muy pequeñas es decir estaban en estadio 5 y no poseían raíces, ya que según Seaton & Ramsay, 2009 el mejor momento para el trasplante de las plántulas cultivadas en condiciones *in vitro* es cuando tienen al menos 5 cm alto y un buen sistema radical, ya que son susceptibles a cambios bruscos de temperatura, humedad y luz, así como al ataque de hongos y bacterias.

Es posible que los hongos simbiotes en el medio sustrato contribuyan a tolerar en las plántulas algún tipo de estrés, favorecer la protección del ataque de patógenos y mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Ordoñez, 2012).

El hongo que favoreció al crecimiento de las plántulas en los tres medios de cultivo fue *Sebacina vermífera*, este hongo fue aislado de la raíz de *Epidendrum sp.* y posiblemente tenga una afinidad simbiótica mayor a las plántulas de la misma especie favoreciendo a la conservación de la misma. Por el contrario el hongo *Ceratobasidium sp.* fue aislado de la raíz de *Trichocereus antenniferum*, por lo tanto es posible que al estar asociado a otra especie no tenga la misma afinidad y permita un menor crecimiento de las plántulas en comparación con *Sebacina vermífera* (Crespo & Sinche, 2017).

CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo de investigación proporciona las siguientes conclusiones:

- El mayor porcentaje de viabilidad de las plántulas del género *Epidendrum* con el hongo *Ceratobasidium sp.* y *Sebacina vermífera* fue en tratamiento *in vitro*, demostrando así que dependen del hongo simbiote para que la planta aproveche los beneficios que éste le provee.
- De la misma manera, el mejor medio para el óptimo crecimiento de las plántulas micorrizadas tanto con el hongo *Ceratobasidium sp.* como para *Sebacina vermífera*, fue el medio Agar Avena (OMA); sin embargo, debido a la variabilidad de los resultados es necesario incrementar el número de repeticiones para corroborar con el análisis estadístico y obtener resultados más fiables y reproducibles.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Los hongos micorrízicos *Ceratobasidium sp.* y *Sebacina vermífera* demostraron tener la capacidad de coadyuvar en el crecimiento de las plántulas de orquídeas del género *Epidendrum*, por ende, es importante utilizar estos microorganismos como parte de la conservación de orquídeas que se encuentran en peligro de extinción.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios similares con otras especies de orquídeas amenazadas para poder favorecer su conservación *ex situ* y preservar la biodiversidad.
- Utilizar el medio Agar avena (OMA) con otras formulaciones, por ejemplo, con hormonas para acelerar el crecimiento de las raíces.
- Se podría aumentar la viabilidad de las plántulas en el medio sustrato, realizando el trasplante a condiciones *ex vitro* cuando estén provistas de raíces, ya que éstas les permiten fijarse, absorber mayor cantidad de agua y nutrientes del medio.



BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano. (2018, abril 7). Sustrato ideal para el cultivo de orquídeas: aprende a prepararlo. Recuperado 30 de octubre de 2018, de <https://lurhi.com/sustrato-ideal-para-el-cultivo-de-orquideas/>
- Arditti, J. (2009). *Micropropagation of Orchids*. John Wiley & Sons.
- Banks, D. (2006). *Cultivo de orquídeas, propagacion y variedades "Orchids at home"*. Universidad de Barcelona.
- Barazani, Benderoth, Groten, Kuhlemeier, & Baldwin. (2005). Piriformospora indica and Sebacia vermifera increase growth performance at the expense of herbivore resistance in Nicotiana attenuata. *Oecologia*, 146(2), 234-243. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0193-2>
- Breddy N. (1991). Orchid mycorrhiza and symbiotic raising techniques, 556-569.
- Camargo S. (2002). Dispersal, distribution and establishment of arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, (71), 33-44.
- Castillo M. (2002). *Micorrización in vitro de Bletia urbana (Orchidaceae) como una estrategia para su reintroducción*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Crespo A, & Sinche J. (2017). *Identificación de Hongos Micorrízicos mediante herramientas de biología molecular*. Universidad de Cuenca. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28498/1/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>
- Damaso. (2013). Biotecnología: medios de cultivo definidos e indefinidos. Recuperado 30 de octubre de 2018, de <http://alvaradobiotech.blogspot.com/2013/02/tarea-medios-de-cultivo.html>
- Damon A. (2017). Estrategia para el rescate, conservación y aprovechamiento sustentable de las orquídeas (orchidaceae) en el sureste de México, 24-30.
- Debergh P, & Zimmerman R. (1991). *Micropropagation: technology and application*. Kluwer Academic. Recuperado de https://books.google.es/books?id=Z_zwaaa
- Díaz, Namur, Bollati, & Arce. (2010). Acclimatization of Phalaenopsis and Cattleya obtained by micropropagation. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 27-40.
- Dijk, Willems, & Van Andel. (1997). Nutrient responses as a key factor to the ecology of orchid species. *Acta Botanica Neerlandica*, 46(4), 339-363. <https://doi.org/10.1111/plb.1997.46.4.339>



- Dodson, C. (2002). *Native Ecuadorian Orchids, Volume 2: Dresslerella - Lepanthes* (Vol. 2). Quito-Ecuador: Soluciones gráficas D&G Cía. Ltda, Quito-Ecuador.
- Dodson C. (2003). *Native Ecuadorian Orchids*. Quito: Colina.
- Dressler R. (2003). Manual de plantas de Costa Rica.
- Etayo, & De Miguel. (1998). Estudio de las Ectomicorrizas en una trufera cultivada situada en Olóriz (Navarra). Recuperado de https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/8390/1/BSB_11_02.pdf
- Haussecker R, & Martiarena, R. (2016). Evaluación de sustratos en la aclimatación de *Catasetum fimbriatum* (C. Morr.)Lindl. & Paxton, en Montecarlo, Misiones. Recuperado 8 de febrero de 2019, de https://www.researchgate.net/publication/306439105_Evaluacion_de_sustratos_en_la_aclimatacion_de_Catasetum_fimbriatum_C_MorrLindl_Paxton_en_Montecarlo_Misiones
- Indacochea, Parrales, Castro, Vera, & Gabriel. (2017). Aclimatación in vitro de especies forestales nativas del Sur de Manabí en peligro de extinción. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(2), 124-134.
- Koltai H, & Kapulnik Y (Eds.). (2010). *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Netherlands. Recuperado de <http://www.springer.com/la/book/9789048194889>
- Kottke, & Suárez. (2009, enero 1). Mutualistic, root-inhabiting fungi of orchids identification and functional types. Recuperado 29 de octubre de 2018, de https://www.researchgate.net/publication/236954911_Mutualistic_root-inhabiting_fungi_of_orchids_identification_and_functional_types
- Lahrmann. (2013). *Genomics and Transcriptomics of the Sebacinoid Fungi Piriformospora Indica and Sebacina Vermifera*.
- López C, & González I. (2006). A propósito de semillas.
- Luan V, Thien N, Khiem D, & Nhut D. (2006). In vitro germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*, 175-177.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2013). Ecuador es el país de las orquídeas.
- Mohan S. (2011). Prospects of in vitro conservation of date palm genetic diversity for sustainable production.
- Montes, Lalama, Echeverría, & Torres. (2016). Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Recuperado 26 de noviembre de 2018, de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5761558>
- Mosquera, Bayman, & Otero. (2010). *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. Recuperado 26 de octubre de 2018, de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/rt/printerFriendly/17661/18523
- Mroginski L, & Roca W. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos Vegetales in-vitro.
- Murashige T, & Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Narváez D. (2014). Orquídeas in vitro. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/12390>
- Nava J, Jiménez A, Sánchez A, Arenas M, & Ventura E, E. (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia Eyermaniana* generadas in vitro, 12.
- Ordoñez, Díez, & Otero. (2012). La vainilla y los hongos formadores de micorrizas. Recuperado de http://www.academia.edu/11684673/La_vainilla_y_los_hongos_formadores_de_micorrizas
- Ordoñez N. (2012). *Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo Rhizoctonia y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de vainilla planifolia jacks*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/6760/1/52518492.2012.pdf?fbclid=IwAR2o4wex46IPyv0UURU2kJS1Z9AavUng3CySQ4n2H1WsX0gC1z9iAEIJNBc>
- Ortega M, Sandoval E, Ramos C, & Chávez V. (2005). Histological development of *Bletia urbana*: an endangered terrestrial orchid from México. *Selbyana*, 309.
- Pedroza J, Serrato L, & Castaño M. (2010). Efecto del carbón activado y ácido indolacético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl, 86-102.
- Porras A, & Bayman P. (2007). *Mycorrhizal fungi of Vanilla: Diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth* (Vol. 99). <https://doi.org/10.3852/mycologia.99.4.510>
- Portilla J, Días, A, & Salazar, L. (2007). *Orquídeas Manual de Cultivo*. Cuenca.
- Pridgeon A, Cribb P, & Rasmussen N. (2006). *Genera Orchidacearum: Volume 4: Epidendroideae (Part 1)*. Oxford, New York: Oxford University Press.

Daniela Niveló Vásquez
Carla Rojas Pallashco



- Rangel V. (2004). *Aislamiento de hongos micorrízicos de orquídeas terrestres de la Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Angel, México, D. F.* (Tesis Profesional). Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Rasmussen N. (1995). Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant.
- Rasmussen N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 244(1), 149-163. <https://doi.org/10.1023/A:1020246715436>
- Roca W, & Mroginski L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. CIAT.
- Santos E. (1997). Orquídeas. *Universidad Tecnológica de la Mixteca*, 1(3).
- Seaton P, & Ramsay M. (2009a). *Cultivo de orquídeas por semilla*. Londres: Royal Botanic Gardens.
- Seaton P, & Ramsay M. (2009b). *Cultivo de Orquídeas por Semillas* (UK ed.). Royal Botanic Gardens, Kew Richmond.
- Seguel A, Rubio R, Carrillo R, Espinosa A, & Borie F. (2008). Niveles de glomalina y su relación con características químicas y biológicas del suelo (andisol) en un relicto de bosque nativo del sur de Chile. *Bosque (Valdivia)*, 29(1), 11-22. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002008000100002>
- Selosse, Richard, He, & Simard. (2006). Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(11), 621-628. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.07.003>
- Smith S, & Read D. (2002). Mycorrhizal Symbiosis. En S. E. Smith & D. J. Read (Eds.), *Mycorrhizal Symbiosis (Second Edition)* (Second, pp. 1-8). London: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012652840-4/50001-2>
- Sneh, Burpee, & Ogoshi. (1998). Identification of Rhizoctonia species. Recuperado 29 de octubre de 2018, de <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=146826160000000061&Rec=7963&Fields=All>
- Yoder J, Zettler L, & Stewart S. (2000). Requisitos de agua de semillas y plántulas de orquídeas terrestres y epífitas, y evidencia de la captación de agua por medio de micotrofos, 2, 145-150.
- Zettler L, & Corey L. (2018). Orchid Mycorrhizal Fungi: Isolation and Identification Techniques, 27-59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_2



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Zettler, L. W., Poulter, S. B., McDonald, K. I., & Stewart, S. L. (2007). Conservation-driven Propagation of an Epiphytic Orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a Mycorrhizal Fungus. *HortScience*, 42(1), 135-139.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ANEXOS

ANEXO A. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

ANEXO A1. Medio Agar avena (OMA)

- Avena 2,5 g
- Agar 10 g
- Agua 1000ml

ANEXO A2. Medio Murashige Skoog (MS) Modificado de banano

Se deben preparar las soluciones madre, evitando que precipiten y en g/100mL. Para esto se requiere pesar cada compuesto necesario para cada solución y disolver en 100 ml de agua.

Solución A (Nitratos)

- KNO_3 (Nitrato de amonio) 8.25 g
- NH_4NO_3 Nitrato de potasio 9.50 g

Solución B (Sulfatos)

- MgSO_4 (Sulfato de magnesio) 1.85 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de manganeso) 0.169 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de zinc) 0.086 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato cúprico) 0.00025 g

Solución C

- CaCl_2 (Cloruro de calcio) 2.2 g
- KI (Yoduro de potasio) 0.0083 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro de cobalto) 0.00025 g

Solución D

- K_3PO_4 (Fosfato de potasio) 1.7g
- H_3BO_3 (Ácido bórico) 0,06 g
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Molibdato de sodio) 0.0025 g

Solución E

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato ferroso) 0.278 g
- Na_2EDTA 0.372 g

Daniela Niveló Vásquez
Carla Rojas Pallashco



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Una vez preparadas las soluciones madre, agregamos 10 ml de cada una en 1000 ml de agua, además se requiere:

- Carbón activado 2g
- Azúcar 200g
- Agar 12 g
- Banano 150g
- Vitamina B1 1ml
- Tween 5 gotas

Calibrar pH a 5.6.

Hervir por un minuto, enfriar y añadir 1ml de vitamina B1. Colocar en los frascos de vidrio y esterilizar.

ANEXO A3. Sustrato

- Musgo tipo *Sphagnum*
- Pino fino
- Piedra caliza

ANEXO B. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE PLÁNTULAS

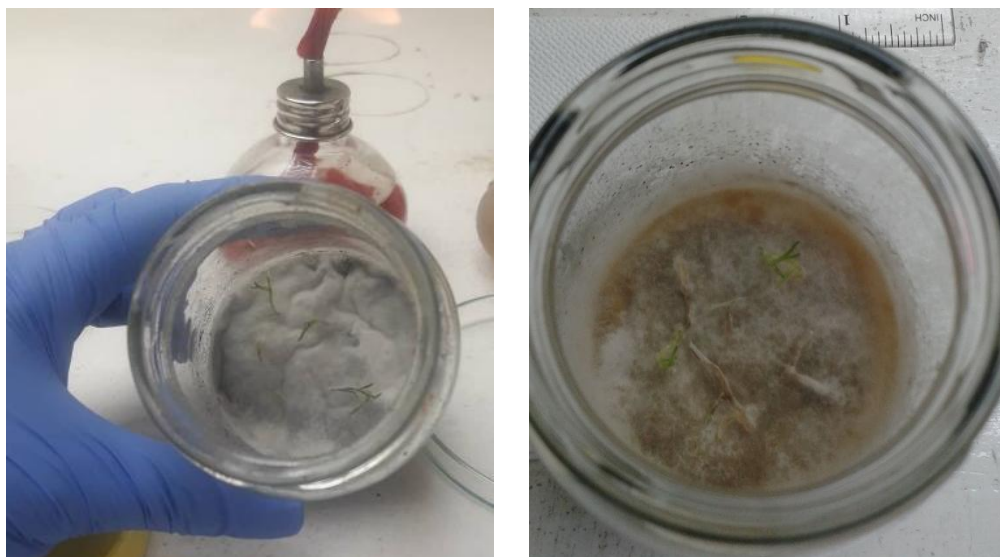


Figura 4. Frascos con plántulas micorizadas con *Ceratobasidium* sp en medio MS Modificado de banano; Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografías:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.

Daniela Niveló Vásquez
Carla Rojas Pallashco



Figura 5. Frasco con plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium* sp en medio Agar avena (OMA); Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.



Figura 6. Medición de plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium* sp en medio MS Modificado de banano; Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Figura 7. Medición de plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium* sp de medio Agar avena (OMA); Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.



Figura 8. Frascos con plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera* en medio MS Modificado de banano; Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.



Figura 9. Frascos con plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera* en medio Agar avena (OMA); Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.



Figura 10. Medición de plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera* de medio MS Modificado de banano; Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.



Figura 11. Medición de plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera* de medio Agar avena (OMA); Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.



Figura 12. Maceta con plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium* sp. en sustrato; Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.



Figura 13. Medición de plántulas micorrizadas con *Ceratobasidium* sp en sustrato; Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.



Figura 14. Maceta con plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera* en sustrato; Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.

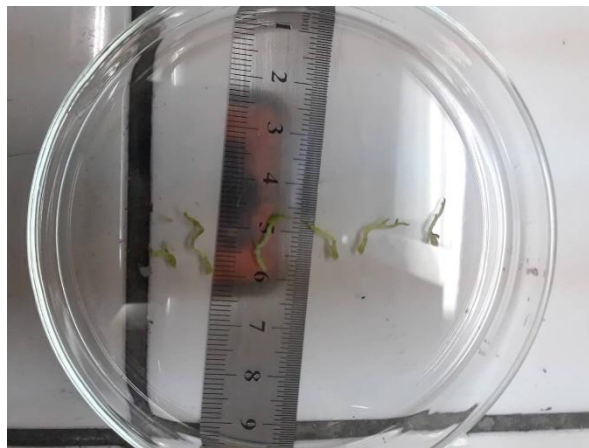


Figura 15. Medición de plántulas micorrizadas con *Sebacina vermífera* en sustrato; Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzay. **Fotografía:** Daniela Niveló V. y Carla Rojas P.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ANEXO C. DATOS DE CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LAS PLÁNTULAS OBTENIDAS DURANTE TODO EL ESTUDIO, MENSUAL Y FINAL

Tabla N.9. Registro de las medidas de crecimiento de las plántulas en los tres medios de cultivo.

Datos obtenidos del crecimiento durante todo el estudio de E19B (<i>Sebacina vermifera</i>)																						
Número de repetición	Medio de cultivo	Medida Inicial (cm)						Promedio de medida inicial	Medida Final (cm)						Promedio de medida final	Diferencia de crecimiento (cm)						Promedio de Crecimiento
		1,2	1,5	1,3	1,3	1,8	1,1		1,3	1,6	1,5	1,5	1,9	1,2		0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	
1	MS Modificado	1,2	1,5	1,3	1,3	1,8	1,1	1,4	1,3	1,6	1,5	1,5	1,9	1,2	1,5	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,13
	OMA	1,7	0,5	1	0,6	0,6	0,7	0,9	2,6	1,4	2,6	2,6	2,1	2,4	2,3	0,9	0,9	1,6	2	1,5	1,7	1,43
	Sustrato	0,6	0,9	0,9	1	1,1	1	0,9	0,8	1,3	1,3	1,2	1,3	0	1	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2		0,28
2	MS Modificado	1,5	1,4	1,4	1,1	1,3	1,4	1,4	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	OMA	1,1	1,2	1,3	0,9	0,9	1	1,1	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	Sustrato	0,9	0,8	1,1	1	1,2	0,9	1	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
3	MS Modificado	0,5	0,4	1,4	1,9	1,9	1,2	1,2	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	OMA	1,4	1,5	1,3	1,2	1	1,1	1,3	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	Sustrato	0,7	1	0,9	1,1	1	1,2	1	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
4	MS Modificado	1,5	1,4	1,6	1,5	1,3	1,3	1,4	1,9	1,7	2	1,8	1,8	1,7	1,8	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,38
	OMA	1,2	1,3	1,5	1,3	1,6	1,6	1,4	3,9	3,6	2,9	3,5	4	1,7	3,3	2,7	2,3	1,4	2,2	2,4	0,1	1,85
	Sustrato	1	1,3	1	1,1	1,2	0,9	1,1	1,1	1,5	1,6	1,7	1,4	1,5	1,5	0,1	0,2	0,6	0,6	0,2	0,6	0,38
5	MS Modificado	0,9	1	1,2	1	1,1	0,9	1	2	2,3	2,3	2,3	2	1,8	2,1	1,1	1,3	1,1	1,3	0,9	0,9	1,10
	OMA	1,2	1,2	1,4	1,3	1,1	1,5	1,3	3,4	4,3	4,7	3,7	5,2	2,9	4	2,2	3,1	3,3	2,4	4,1	1,4	2,75
	Sustrato	0,9	1,1	1	1,2	1	1,1	1,1	1,6	0	0	0	0	0	0,3	0,7	-1,1	-1,0	-1,2	-1,0	-1,1	-0,78
6	MS Modificado	1,1	1,2	1,2	1,3	1,1	1,1	1,2	1,5	1,3	1,5	1,4	1,6	1,3	1,4	0,4	0,1	0,3	0,1	0,5	0,2	0,27
	OMA	1	0,9	0,9	0,8	0,9	0,6	0,9	1,4	1,2	1,4	0,9	1,5	1,1	1,3	0,4	0,3	0,5	0,1	0,6	0,5	0,40
	Sustrato	0,9	0,8	1	0,8	1,1	0,9	0,9	1,5	1,7	1,1	1,7	0	0	1	0,6	0,9	0,1	0,9	-1	-1	0,08
7	MS Modificado	1,2	1,4	1,3	1,1	1,2	1,4	1,3	1,6	2,7	2,1	1,5	1,9	2	2	0,4	1,3	0,8	0,4	0,7	0,6	0,70
	OMA	1,2	1,4	1,2	1,3	1,2	1,1	1,2	2,2	3,2	3,4	2,6	2,9	3,1	2,9	1	1,8	2,2	1,3	1,7	2	1,67
	Sustrato	1	1,1	0,9	1	1,3	1,3	1,1	1,1	1,3	1	1,6	1,4	1,5	1,3	0,1	0,2	0,1	0,6	0,1	0,2	0,22
8	MS Modificado	1,6	1,4	1,3	1,2	1,1	1,2	1,3	2,3	1,8	2	1,6	1,4	2,9	2	0,7	0,4	0,7	0,4	0,3	1,7	0,70
	OMA	0,9	0,8	1,1	0,7	0,7	1	0,9	2,2	2,5	1,9	1,8	1,7	1,8	2	1,3	1,7	0,8	1,1	1	0,8	1,12
	Sustrato	0,6	1	0,8	1,1	0,8	0,7	0,8	0,8	1,5	1,1	1,4	1,1	1	1,2	0,2	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,32
9	MS Modificado	0,6	0,7	0,5	0,6	0,5	0,4	0,6	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	OMA	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7	0,6	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	Sustrato	0,5	0,6	0,8	0,9	1	0,7	0,8	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
10	MS Modificado	1,2	1,3	1,2	1,4	1,2	1,2	1,3	1,9	2	1,8	2,2	2,1	0	1,7	0,7	0,7	0,6	0,8	0,9	-1	0,42
	OMA	1	1,1	1,2	1,1	0,9	1	1,1	2,5	2,7	3,5	3,2	2,5	1,5	2,7	1,5	1,6	2,3	2,1	1,6	0,5	1,60
	Sustrato	0,9	1	1,1	0,9	0,8	1	1	1,6	0	0	0	0	0	0,3	0,7	-1,0	-1,1	-0,9	-0,8	-1,0	-0,68
11	MS Modificado	1	1,4	1,2	1,1	1,1	1,6	1,2	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	OMA	1,2	1,2	1,4	1,6	1,6	1,2	1,4	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	Sustrato	1,2	1,5	1	1,1	0,8	1,3	1,2	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
12	MS Modificado	1,6	2,2	1,4	1,6	0,9	1,1	1,5	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	OMA	1,6	0,9	1	0,7	1,4	1,5	1,2	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	Sustrato	1	1	1,7	1,5	1,6	1,5	1,4	1	1,1	1,9	1,6	1,9	1,7	1,5	0	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,14
13	MS Modificado	1,2	0,9	0,9	1	0,6	1,1	1,0	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	OMA	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6	0,7	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
	Sustrato	2,2	1,6	1,4	1	0,9	1,2	1,4	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	



UNIVERSIDAD DE CUENCA

14	MS Modificado	1	1,8	0,8	0,8	0,6	1,5	1,1	2	2,4	1,5	1,9	2,3	0	1,7	1	0,6	0,7	1,1	1,7	0	0,85
	OMA	1,3	1,6	1	1,2	1,8	1,9	1,5	2	3,6	2,4	2	3,7	3,5	2,9	0,7	2	1,4	0,8	1,9	1,6	1,4
	Sustrato	1	2,2	0,9	1	1,3	0,9	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	MS Modificado	1,3	1,4	1	1,6	1,6	1,2	1,4	1,6	1,9	1,6	1,8	1,9	1,5	1,7	0,3	0,5	0,6	0,2	0,3	0,3	0,37
	OMA	1,5	1,5	1,2	1,1	0,8	0,9	1,2	1,7	1,6	1,3	1,3	1	1	1,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,15
	Sustrato	1,6	0,7	1,1	0,9	1,4	1,1	1,1	1,7	0,9	1,3	1	1	1,6	1,2	1,3	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,15
16	MS Modificado	1,2	1	1,2	1,4	1,5	1,4	1,3	1,6	1,2	1,4	1,5	1,6	1,5	1,5	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,18
	OMA	1,1	0,8	1	0,8	0,9	1	0,9	1,4	1,1	1,3	1	1,2	1,1	1,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,1	0,25
	Sustrato	1	0,8	0,8	0,9	1,1	1,1	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	MS Modificado	0,9	0,8	1,2	0,9	0,8	1	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OMA	0,9	1,5	1	0,9	0,8	0,9	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sustrato	1	1	1,1	0,8	1	1,1	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	MS Modificado	0,7	1	1	0,8	1	1,2	1,0	0,9	1,5	1,2	1,4	1,6	2	1,4	0,2	0,5	0,2	0,6	0,6	0,8	0,48
	OMA	1,2	1	0,9	1,4	1,8	1,1	1,2	1,7	1,5	1,9	2,3	2,4	1,8	1,9	0,5	0,5	1	0,9	0,6	0,7	0,7
		1	0,9	0,7	1	1,1	0,7	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	MS Modificado	0,8	1	0,8	1	1	1,3	1,0	0,9	1,1	1,2	0	0	0	0,5	0,1	0,1	0,4	0	0	0	0,1
	OMA	1	0,6	1,2	0,8	1,2	0,9	1,0	1,2	0,8	1,4	1,3	1,4	1,1	1,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2	0,25
	Sustrato	1,1	0,7	0,9	1	0,8	1	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	MS Modificado	1,5	0,7	1	0,8	1,2	1	1,0	1,6	1	1,2	1,1	1,3	0	1	0,1	0,3	0,2	0,3	0,1	-1	0
	OMA	0,8	0,8	0,9	0,7	1	1	0,9	1,1	1,4	1,2	0,8	1,1	1,1	1,1	0,3	0,6	0,3	0,1	0,1	0,1	0,25
	Sustrato	0,9	0,8	0,8	0,9	1	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	MS Modificado	1,1	1,3	1,1	1,1	1,1	1	1,1	1,6	1,5	1,5	1,5	1,3	1,6	1,5	0,5	0,2	0,4	0,4	0,2	0,6	0,38
	OMA	1,1	0,9	1	1,4	1,1	1,2	1,1	1,3	1,4	1,5	2,1	1,4	1,4	1,5	0,2	0,5	0,5	0,7	0,3	0,2	0,40
22	MS Modificado	1	0,9	1	0,8	0,8	0,6	0,9	1,5	1,2	1,3	1,1	1,1	1	1,2	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,35
	OMA	1,1	0,9	0,7	0,8	0,9	0,7	0,9	1,3	1,2	1,3	1,2	1,1	1,1	1,2	0,2	0,3	0,6	0,4	0,2	0,4	0,35
23	MS Modificado	0,5	0,7	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5	0,9	1,1	1,2	0	0	0	0,5	0,4	0,4	0,7	-1	-0	-0	0,02
	OMA	0,5	0,4	0,6	0,7	0,6	0,4	0,5	0,9	1	1	1,2	1,2	0,9	1	0,4	0,6	0,4	0,5	0,6	0,5	0,50
24	MS Modificado	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OMA	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,7	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	MS Modificado	1,1	1	1,1	1,2	1,1	1	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OMA	1,3	1,1	0,8	0,6	0,7	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	MS Modificado	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OMA	0,6	0,8	0,6	0,5	0,6	0,8	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	MS Modificado	0,5	0,6	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OMA	0,8	0,4	0,5	0,4	0,3	0,3	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	MS Modificado	1,1	1,2	1,3	1,2	1,7	1,3	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OMA	1,8	0,6	1,5	1,4	1,1	1,1	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	MS Modificado	1,2	1,1	1	1,2	1,1	1,2	1,1	1,6	1,5	1,4	1,7	1,6	1,5	1,6	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,3	0,42
	OMA	0,8	1,3	1,1	0,9	0,9	0,8	1	1,3	1,4	1,7	1,2	1	1,2	1,3	0,5	0,1	0,6	0,3	0,1	0,4	0,33
30	MS Modificado	0,7	0,5	0,4	1	0,7	0,7	0,7	1,7	1,1	1,5	0	0	0	0,7	1	0,6	1,1	-1	-1	-1	0,05
	OMA	0,9	1,2	0,9	0,8	0,9	0,7	0,9	2,5	1,5	1	1,2	1,3	1,7	1,5	1,6	0,3	0,1	0,4	0,4	1	0,63

Tabla N. 10. Registro de las medidas de crecimiento de las plántulas en los tres medios de cultivo.

Datos obtenidos del crecimiento durante todo el estudio de IM7B (<i>Ceratobasidium sp.</i>)																											
Número de repetición	Medio de cultivo	Medida Inicial (cm)						Promedio de medida inicial	Medida Final (cm)						Promedio de medida final	Diferencia de crecimiento (cm)						Promedio de Crecimiento					
1	MS Modificado	1,2	1	1,4	1,1	1,4	1,3	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OMA	1	0,8	0,5	0,7	0,7	0,5	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Sustrato	0,8	0,7	0,7	1	0,6	0,7	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	MS Modificado	1,2	1	0,9	1	1,2	1	1,1	1,4	1,4	1	1,3	1,5	0	1,1	0,2	0,4	0,1	0,3	0,3	-1,0						0,05
	OMA	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,9	0,9	0,9	0,9	0	0	0,6	0,4	0,3	0,4	0,3	-0,5	-0,6					0,05	
	Sustrato	0,6	0,5	1	0,9	0,6	0,5	0,7	1,4	1,4	1,9	1,5	1	0,9	1,4	0,8	0,9	0,9	0,6	0,4	0,4						0,67
3	MS Modificado	1	1	0,7	1	0,6	0,5	0,8	1,1	0	0	0	0	0	0,2	0,1	-1,0	-0,7	-1,0	-0,6	-0,5						-0,62
	OMA	1,2	0,6	0,9	1,1	1,7	0,7	1	2,6	2,5	1,5	1,6	2,5	0	1,8	1,4	1,9	0,6	0,5	0,8	-1					0,75	
	Sustrato	1,1	0,8	1	1,2	0,9	1,2	1	1,5	1,6	1,2	1,6	1,5	1,5	1,5	0,4	0,8	0,2	0,4	0,6	0,3					0,45	
4	MS Modificado	1,1	1,3	1,1	1,1	1	1,7	1,2	1,8	1,6	1,5	0	0	0	0,8	0,7	0,3	0,4	-1,1	-1,0	-1,7						-0,41
	OMA	0,8	0,8	0,7	0,8	0,5	0,6	0,7	1,5	0,9	1,1	1,1	0,9	0,7	1	0,7	0,1	0,4	0,3	0,4	0,1					0,33	
	Sustrato	0,6	0,8	0,7	1	0,7	0,9	0,8	1,2	1,3	1	1,4	1	1,2	1,2	0,6	0,5	0,3	0,4	0,3	0,3					0,40	
5	MS Modificado	0,7	0,8	0,8	0,6	0,7	0,6	0,7	0	0	0	0	0	0	0	-0,7	-0,8	-0,8	-0,6	-0,7	-0,6						-0,70
	OMA	0,9	1	0,9	1	0,6	1,1	0,9	1,8	2,8	2,6	2,5	1,1	2	2,1	0,9	1,8	1,7	1,5	0,5	0,9					1,22	
	Sustrato	0,8	0,9	0,8	0,9	1	1	0,9	0,9	1	1,2	1,1	1,2	1,3	1,1	0,1	0,1	0,4	0,2	0,2	0,3					0,22	
6	MS Modificado	0,6	0,8	0,6	0,6	0,7	0,4	0,6	0	0	0	0	0	0	0	-0,6	-0,8	-0,6	-0,6	-0,7	-0,4						-0,62
	OMA	0,6	0,5	0,7	0,5	0,6	0,6	0,6	1	1,2	1,5	0	0	0	0,6	0,4	0,7	0,8	-0,5	-0,6	-0,6					0,03	
	Sustrato	0,5	0,6	0,6	0,8	0,5	0,6	0,6	1	0,9	1,2	1,2	1,5	1,1	1,2	0,5	0,3	0,6	0,4	1,0	0,5					0,55	
7	MS Modificado	0,8	0,6	0,7	0,5	0,6	1	0,7	0	0	0	0	0	0	0	-0,8	-0,6	-0,7	-0,5	-0,6	-1,0						-0,70
	OMA	0,8	0,5	0,9	0,8	0,9	0,6	0,8	0,9	0,6	1,1	1,1	1	0,9	0,9	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3					0,18	
	Sustrato	0,9	0,8	0,8	1	0,9	1,1	0,9	1,2	1,5	1,3	0	0	0	0,7	0,3	0,7	0,5	-1,0	-0,9	-1,1					-0,25	
8	MS Modificado	1,1	1	0,6	0,7	1	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	OMA	1,1	1,1	1,1	0,9	0,7	0,9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	Sustrato	1	0,8	0,9	0,8	1	1	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
9	MS Modificado	1,3	1	0,9	1	1	0,7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	OMA	0,6	1	0,8	0,9	0,6	1,1	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	Sustrato	0,9	0,7	1	1	0,8	0,6	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
10	MS Modificado	1,1	1,2	0,8	1	0,9	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	OMA	1,3	1	0,7	1,2	1,2	1,1	1,1	2,4	1,6	1,1	3	0	0	1,4	1,1	0,6	0,4	1,8	-1,2	-1,1					0,27	
	Sustrato	1	0,9	1,1	0,8	0,7	1	0,9	1,7	1,6	1,4	1,1	1	1,5	1,4	0,7	0,7	0,3	0,3	0,3	0,5					0,47	
11	MS Modificado	1	1,1	0,9	1,2	1,1	1	1,1	1,3	1,7	1,5	1,4	0	0	1	0,3	0,6	0,6	0,2	0	0					0,28	
	OMA	1,2	1,3	1,3	1,1	1	1,1	1,2	1,5	1,7	1,7	1,3	0	0	1	0,3	0,4	0,4	0,2	0	0					0,22	
	Sustrato	1,4	2,1	1,5	1,5	1,9	1,5	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	
12	MS Modificado	1,7	1,5	2	2	1,9	2,5	1,9	2	2,5	2,1	2,4	0	0	1,5	0,3	1	0,1	0,4	0	0					0,3	
	OMA	1,3	1,2	1,2	1,3	1,1	1,1	1,2	2	2	0	0	0	0	0,7	0,7	0,8	0	0	0	0					0,25	
	Sustrato	1,7	1,3	1,7	1,5	1,2	1,5	1,5	1,7	1,3	1,8	1,5	1,2	1,6	1,5	0	0	0,1	0	0	0					0,03	
13	MS Modificado	1,1	1,2	0,9	1,4	1,2	1,1	1,2	1,2	1,3	1,2	0	0	0	0,6	0,1	0,1	0,3	0	0	0					0,08	
	OMA	1,1	1,1	0,9	1	1,1	0,8	1,0	1,5	1,3	1,2	1,2	1,6	0	1,1	0,4	0,2	0,3	0,2	0,5	0					0,27	
	Sustrato	1,5	2	1,9	2	1,8	1,5	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	
14	MS Modificado	1,1	1,2	1	1,1	1	1,1	1,1	1,3	1,4	1,3	1,2	1,3	0	1,1	0,2	0,2	0,3	0,1	0,3	0					0,18	
	OMA	0,7	0,6	0,8	0,9	0,8	0,6	0,7	0,8	1,2	1,2	1,3	0,9	0	0,9	0,1	0,6	0,4	0,4	0	0					0,25	
	Sustrato	1,4	1,5	1,9	1,3	2,3	2	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	
15	MS Modificado	0,8	0,8	1	0,7	0,6	0,7	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	
	OMA	0,5	0,5	0,6	0,4	0,3	0,4	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	
	Sustrato	1,8	1,5	1,5	1,5	1,6	2,4	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	
16	MS Modificado	1,6	1,3	1,4	1,5	1,6	1,4	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	
	OMA	1,1	1,2	1,1	1	1,3	1,1	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	
	Sustrato	2	1,9	1,3	1,4	1,2	1,7	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	
17	MS Modificado	0,7	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1					-0,6	
	OMA	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	0,6	1,7	2,4	2,2	2,6	1,8	0	1,8	1,1	1,9	1,6	2,1	1,3	0					1,33	
	Sustrato	1,2	1,3	1,1	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4	1,1	1,5	1,3	1,3	1,3	0,1	0,1	0	0,1	0	0					0,05	
18	MS Modificado	2,5	1,2	1,4	1,6	2,3	1,3	1,7	0	0	0	0	0	0	0	-3	-1	-1	-2	-2	-1					-1,72	
	OMA	2,3	1,2	1,1	0,9	1	0,9	1,2	4	0	0	0	0	0	0,7	1,7	-1	-1	-1	-1	-1					-0,57	
	Sustrato	1,3	1,1	1,2	1,2	1	1,2	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	



Tabla N. 11. Registro de la supervivencia de las plántulas en los tres medios de cultivo.

Registro de supervivencia durante todo el estudio de E19B (*Sebacina vermífera*)

Número de repetición	Medio de cultivo	31/5/2018	21/6/2018	9/7/2018	23/7/2018	7/8/2018	20/8/2018	3/9/2018	21/9/2018	26/10/2018
1	MS Modificado	6	6	6	0	0	0	0	0	0
	OMA	6	6	6	0	0	0	0	0	0
	Sustrato	6	6	6	6	6	6	5	4	4
2	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	6	6	5
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sustrato	6	6	6	6	6	6	4	4	4
3	MS Modificado	6	6	6	6	6	5	5	5	4
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	6	5
	Sustrato	6	6	6	6	6	6	6	6	6
4	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	0	0	0
	OMA	6	6	6	6	6	6	0	0	0
	Sustrato	6	6	6	5	5	4	4	2	2
5	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	6	0	0
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	0	0
	Sustrato	6	6	3	3	3	3	1	1	1
6	MS Modificado	6	6	0	0	0	0	0	0	0
	OMA	6	6	0	0	0	0	0	0	0
	Sustrato	6	5	4	4	4	4	3	3	2
7	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	6	0	0
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	0	0
	Sustrato	6	6	6	6	6	6	6	5	5
8	MS Modificado	6	6	6	6	6	0	0	0	0
	OMA	6	6	6	6	6	0	0	0	0
	Sustrato	6	6	6	6	6	6	6	5	5
9	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	6	6	5
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sustrato	6	6	6	6	6	6	6	6	6
10	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	6	0	0
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	0	0
	Sustrato	6	6	6	1	1	1	1	1	1



Tabla N. 12. Registro de la supervivencia de las plántulas en los tres medios de cultivo.

Registro de supervivencia durante todo el estudio de E19B (*Sebacina vermifera*)

Número de repetición	Medio de cultivo	14/6/2018	9/7/2018	23/7/2018	7/8/2018	20/8/2018	3/9/2018	21/9/2018	26/10/2018	31/10/2018	7/11/2018	12/11/2018
11	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	5	5	-	-	-
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	4
12	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	5	5	-	-	-
	OMA	6	6	6	6	6	6	5	5	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	4
13	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	5	5	-	-	-
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	4
14	MS Modificado	6	6	6	6	6	4	4	0	-	-	-
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	5	2
15	MS Modificado	6	6	0	0	0	0	0	0	-	-	-
	OMA	6	6	0	0	0	0	0	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	5
16	MS Modificado	6	6	6	6	0	0	0	0	-	-	-
	OMA	6	6	6	6	0	0	0	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	4	3
17	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-	-
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	6	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	2
18	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	0	0	-	-	-
	OMA	6	6	6	6	6	6	0	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	5	3
19	MS Modificado	6	6	5	5	4	4	0	0	-	-	-
	OMA	6	6	6	6	6	6	0	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	3
20	MS Modificado	6	6	6	6	5	0	0	0	-	-	-
	OMA	6	6	6	6	6	0	0	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	5



Tabla N. 13. Registro de la supervivencia de las plántulas en los dos medios de cultivo.

Registro de supervivencia durante todo el estudio de E19B
(*Sebacina vermifera*)

Número de repetición	Medio de cultivo	9/7/2018	23/7/2018	7/8/2018	20/8/2018	3/9/2018	21/9/2018	26/10/2018
21	MS Modificado	6	6	5	0	0	0	0
	OMA	6	6	6	0	0	0	0
22	MS Modificado	6	6	5	5	5	0	0
	OMA	6	6	6	6	6	0	0
23	MS Modificado	6	6	6	6	6	0	0
	OMA	6	6	6	6	6	0	0
24	MS Modificado	6	6	6	6	6	5	3
	OMA	6	6	6	6	6	5	5
25	MS Modificado	6	6	6	6	6	6	3
	OMA	6	6	6	6	5	5	4
26	MS Modificado	6	6	4	4	4	4	3
	OMA	6	6	6	5	5	5	4
27	MS Modificado	6	6	4	4	4	4	4
	OMA	6	6	6	5	5	5	4
28	MS Modificado	6	6	5	5	5	3	1
	OMA	6	6	5	5	5	5	3
29	MS Modificado	6	6	5	5	0	0	0
	OMA	6	6	6	6	0	0	0
30	MS Modificado	6	6	5	5	5	0	0
	OMA	6	6	6	6	6	0	0



Tabla N. 14. Registro de la supervivencia de las plántulas en los tres medios de cultivo.

Registro de supervivencia durante todo el estudio de IM7B
(*Ceratobasidium sp.*)

Número de repetición	Medio de cultivo	31/5/2018	21/6/2018	9/7/2018	23/7/2018	7/8/2018	20/8/2018	3/9/2018	21/9/2018	26/10/2018
1	MS Modificado	6	6	0	0	0	0	0	0	0
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sustrato	6	6	5	5	5	5	5	5	4
2	MS Modificado	6	6	6	6	4	0	0	0	0
	OMA	6	6	6	4	4	0	0	0	0
	Sustrato	6	6	4	4	4	4	4	4	4
3	MS Modificado	6	6	4	4	2	2	1	0	0
	OMA	6	5	5	5	5	5	5	0	0
	Sustrato	6	6	5	5	5	5	5	5	5
4	MS Modificado	6	6	3	0	0	0	0	0	0
	OMA	6	6	6	0	0	0	0	0	0
	Sustrato	6	6	5	5	5	4	4	4	3
5	MS Modificado	6	6	0	0	0	0	0	0	0
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	6	0
	Sustrato	6	6	6	6	6	6	6	2	2
6	MS Modificado	6	6	0	0	0	0	0	0	0
	OMA	6	3	3	3	3	3	0	0	0
	Sustrato	6	6	3	3	3	3	3	3	3
7	MS Modificado	6	6	0	0	0	0	0	0	0
	OMA	6	5	0	0	0	0	0	0	0
	Sustrato	6	6	5	5	5	5	5	5	5
8	MS Modificado	6	6	4	4	4	3	0	0	0
	OMA	6	6	4	4	4	3	3	3	3
	Sustrato	6	6	4	4	4	4	4	2	2
9	MS Modificado	6	6	4	4	2	2	2	2	2
	OMA	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sustrato	6	6	4	4	4	4	4	4	4
10	MS Modificado	6	6	5	0	0	0	0	0	0
	OMA	6	4	4	4	4	4	0	0	0
	Sustrato	6	6	6	6	6	6	6	6	6



Tabla N. 15. Registro de la supervivencia de las plántulas en los tres medios de cultivo.

Registro de supervivencia durante todo el estudio de IM7B (*Ceratobasidium sp.*)

Número de repetición	Medio de cultivo	14/6/2018	9/7/2018	23/7/2018	7/8/2018	20/8/2018	3/9/2018	21/9/2018	26/10/2018	31/10/2018	7/11/2018	12/11/2018
11	MS Modificado	6	4	0	0	0	0	0	0	-	-	-
	OMA	6	6	0	0	0	0	0	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	5	4
12	MS Modificado	6	4	4	4	4	4	0	0	-	-	-
	OMA	6	5	4	3	2	2	0	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	5	3
13	MS Modificado	6	3	3	3	3	3	0	0	-	-	-
	OMA	6	6	6	5	5	5	0	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	4	4
14	MS Modificado	6	4	4	4	0	0	0	0	-	-	-
	OMA	6	5	4	4	0	0	0	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	5	4
15	MS Modificado	6	4	4	4	4	3	3	1	-	-	-
	OMA	6	6	5	5	5	5	5	4	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	3	3
16	MS Modificado	6	4	3	1	1	1	1	1	-	-	-
	OMA	6	6	5	5	5	5	5	5	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	4	4
17	MS Modificado	6	3	3	3	2	2	2	2	-	-	-
	OMA	6	6	5	5	4	4	4	4	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	4	4
18	MS Modificado	6	3	3	0	0	0	0	0	-	-	-
	OMA	6	4	1	1	1	0	0	0	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	4	4
19	MS Modificado	6	3	3	3	3	3	2	1	-	-	-
	OMA	6	6	5	5	5	5	5	5	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	4	4
20	MS Modificado	6	3	3	3	2	2	1	1	-	-	-
	OMA	6	5	5	4	4	4	4	4	-	-	-
	Sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-	6	4	4



Tabla N. 16. Registro de la supervivencia de las plántulas en los dos medios de cultivo.

Registro de supervivencia durante todo el estudio de IM7B
(*Ceratobasidium* sp.)

Número de repetición	Medio de cultivo	9/7/2018	23/7/2018	7/8/2018	20/8/2018	3/9/2018	21/9/2018	26/10/2018
21	MS Modificado	6	3	3	1	0	0	0
	OMA	6	5	3	3	0	0	0
22	MS Modificado	6	3	3	3	3	2	0
	OMA	6	4	4	4	4	4	0
23	MS Modificado	6	4	2	2	1	0	0
	OMA	6	4	4	3	3	0	0
24	MS Modificado	6	4	3	0	0	0	0
	OMA	6	5	5	0	0	0	0
25	MS Modificado	6	4	4	3	3	3	1
	OMA	6	5	4	4	4	4	4
26	MS Modificado	6	3	3	3	3	3	1
	OMA	6	5	4	4	4	4	4
27	MS Modificado	6	3	3	3	2	2	1
	OMA	6	5	4	4	4	3	3
28	MS Modificado	6	4	3	3	3	3	0
	OMA	6	6	5	5	5	5	5
29	MS Modificado	6	4	3	3	3	3	1
	OMA	6	6	5	5	5	5	5
30	MS Modificado	6	4	4	3	2	0	0
	OMA	6	6	5	5	4	0	0

GLOSARIO

Aclimatación: conseguir que un ser vivo se adapte a un clima o a un entorno distinto al que está acostumbrado.

Agaricomycetos: hongos que forman unas estructuras llamadas micorrizas en las puntas de las raíces de la mayoría de plantas en las cuales el hongo cede minerales a la planta y la planta alimenta al hongo con azúcares y otras sustancias.

Autótrofo: es un organismo que puede producir su propio alimento a partir de sustancias inorgánicas.

Basidiocarpos: estructura multicelular sobre la que se dispone el himenio productor de esporas.

Basidiosporas: espora reproductiva producida por los hongos de la división de los basidiomicetes.

Brácteas: órganos foliares muy importantes para las plantas que producen flores

Ex situ: actuaciones para la conservación de especies y poblaciones que se desarrollan fuera del ambiente natural.

Fotosintetatos: compuestos de carbono que pueden ser descompuestos por hongos.

Glicoproteínas: son proteínas (principalmente las proteínas intrínsecas de membrana y de secreción) que son modificadas después de la traducción para unir covalentemente una parte oligosacárida.

Glomalina: compuesto proveniente del suelo, provee una bóveda segura para el almacenamiento del carbono en el suelo.

Humedad relativa: mide la cantidad de agua en el aire en forma de vapor, comparándolo con la cantidad máxima de agua que puede ser mantenida a una temperatura dada.

In vitro: aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas o morfogénicas a partir de estos explantes.

Labelo: pétalo medio superior en las orquídeas, diferentes a los pétalos laterales en forma, color y tamaño.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Monocultivo: se refiere a plantaciones de gran extensión con el cultivo de una sola especie, con los mismos patrones, resultando en una similitud genética, utilizando los mismos métodos de cultivo para toda la plantación (control de plagas, fertilización y alta estandarización de la producción), lo que hace más eficiente la producción a gran escala.

Pedicelo: soporte delgado y alargado que sostiene una sola flor.

Protocormo: masa de células que provee al hongo con ciertas vitaminas y un hábitat donde vivir.

Pseudobulbo: tuberosidades de naturaleza mixta, caulinares superiormente y radicales en su parte inferior, como las de muchas orquídeas terrícolas.

Rhizoctonia: hongo que se caracteriza por la producción de esclerocios en una textura uniforme con redes hifales que unen el micelio con plantas.

Rizosfera: región del suelo cuya actividad biológica es influenciada por las raíces de las plantas.

Simbiosis: es una relación que se da entre dos *simbiontes* (*animales o vegetales*) de *diferentes especie*, en la que ambos asociados sacan provecho de la vida en común.

Taxón: grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados, asignándole al grupo un nombre en latín, una descripción, y un "tipo", de forma que el taxón de una especie es un espécimen o ejemplar concreto.

Vascular: plantas superiores o cormófitas que forman parte de la flora. Su principal característica es que presentan una diferenciación real de tejidos en raíz, tallo, hojas, flores.

Velamen: es una rizodermis especializada que consta de células muertas a la madurez con engrosamientos de lignina en la pared celular.